

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-146976

(P2000-146976A)

(43) 公開日 平成12年5月26日 (2000.5.26)

(51) IntCl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/543

21/27

識別記号

5 9 5

F I

G 0 1 N 33/543

21/27

テマコード (参考)

5 9 5 2 G 0 5 9

C

審査請求 未請求 請求項の数49 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号

特願平10-318087

(22) 出願日

平成10年11月9日 (1998.11.9)

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年5月9日 社  
団法人日本分析化学会発行の「第59回分析化学討論会講  
演要旨集」に発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 鈴木 孝治

神奈川県川崎市幸区小倉1丁目1-A705  
号

(74) 代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

Fターム (参考) 2G059 AA01 BB12 CC16 DD13 EE20

FF06

(54) 【発明の名称】 SPRセンサー用金属薄膜、その製法およびそれを用いた測定方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、センサー表面を様々な特性や機能を有する高分子を用いて化学修飾することで、より多くの生体成分を検出できるセンサーデバイスを提供する。より具体的には、金属薄膜をセンサー基盤として用い、デバイスとして表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) 装置を使用して、抗原-抗体反応を利用した高感度免疫センサーを提供する。

【解決手段】 本発明は、自由電子金属表面を有する金属薄膜の表面が、(1) 金属表面に固定され得る官能基及びポリマーと結合し得る官能基を有する有機リンカー、並びに、(2) 検出用試薬に直接結合し得る官能基若しくは検出用試薬にスパーサーを介して結合し得る官能基及び前記有機リンカーと結合し得る官能基を有するポリマー、で処理されてなる金属薄膜に関する。より詳細には、本発明は、当該ポリマーが、キトサン又はポリエチレンイミンなどのアミノ基を有するポリマーである前記金属薄膜に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 自由電子金属表面を有する金属薄膜の表面が、(1) 金属表面に固定され得る官能基及びポリマーと結合し得る官能基を有する有機リンカー、並びに、(2) 検出用試薬に直接結合し得る官能基若しくは検出用試薬にスペーサーを介して結合し得る官能基及び前記有機リンカーと結合し得る官能基を有するポリマー、で処理されてなる金属薄膜。

【請求項2】 有機リンカーの、金属表面に固定され得る官能基とポリマーと結合し得る官能基の間が、炭素原子、酸素原子、及び、窒素原子からなる群から選ばれる原子からなり、直鎖部分が2～20原子である直鎖状若しくは分枝状又は環状の化学構造である請求項1に記載の金属薄膜。

【請求項3】 有機リンカーが、2種以上の有機化合物が結合したものである請求項1又は2に記載の金属薄膜。

【請求項4】 有機リンカーの金属表面に固定され得る官能基が、硫黄原子を含有する官能基である請求項1～3のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項5】 有機リンカーの金属表面に固定され得る官能基が、メルカプト基、スルフィド基又はジスルフィド基である請求項4に記載の金属薄膜。

【請求項6】 有機リンカーを形成し、金属表面に固定され得る官能基を有する有機化合物が、硫黄原子を含有する官能基を含有するアミノ酸又はその誘導体である請求項1～5のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項7】 有機リンカーを形成し、金属表面に固定され得る官能基を有する有機化合物がシステイン又はそのエステル誘導体である請求項6に記載の金属薄膜。

【請求項8】 有機リンカーのポリマーと結合し得る官能基が、カルボニル基、アミノ基若しくはカルボキシル基又はこれらの誘導体である請求項1～7のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項9】 有機リンカーが、システイン又はそのエステル誘導体、及び、グルタルアルデヒドから誘導されるものである請求項1～8のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項10】 有機リンカーが、メルカプト基、スルフィド基又はジスルフィド基を有する炭素数2～20の脂肪酸である請求項1～9のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項11】 ポリマーの検出用試薬に直接結合し得る官能基若しくは検出用試薬にスペーサーを介して結合し得る官能基が、アミノ基、カルボキシル基若しくは水酸基又はこれらの誘導体である請求項1～10のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項12】 ポリマーが、ポリマーの主鎖又は側鎖にアミノ基を有するポリマーである請求項11に記載の金属薄膜。

【請求項13】 ポリマーが、アミノ糖を含有する多糖類である請求項12に記載の金属薄膜。

【請求項14】 ポリマーが、キトサンである請求項13に記載の金属薄膜。

【請求項15】 ポリマーが、ポリ低級アルキレンイミンである請求項12に記載の金属薄膜。

【請求項16】 金属薄膜の片面のみが処理されている請求項1～15のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項17】 金属薄膜の薄膜の厚さが50～1000nmである請求項1～16のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項18】 金属薄膜の金属が、金、銀、銅、アルミニウム又はクロムのいずれか1種である請求項1～17に記載の金属薄膜。

【請求項19】 金属薄膜の金属が、金である請求項18に記載の金属薄膜。

【請求項20】 ポリマーにさらに、検出用試薬が直接又は検出用試薬に結合し得る官能基を有するスペーサーを介して検出用試薬が結合している請求項1～19のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項21】 スペーサーが、ポリマーに結合し得る官能基及び検出用試薬に結合し得る官能基を有する有機化合物である請求項20に記載の金属薄膜。

【請求項22】 検出用試薬に結合し得る官能基が、カルボキシル基又はその反応性誘導体である請求項21に記載の金属薄膜。

【請求項23】 検出用試薬が、蛋白質である請求項20～22のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項24】 蛋白質が抗原又は抗体である請求項23に記載の金属薄膜。

【請求項25】 金属薄膜が、基板に密着している請求項1～24のいずれかに記載の金属薄膜。

【請求項26】 基板がプリズムである請求項25に記載の金属薄膜。

【請求項27】 金属薄膜が表面プラズモン共鳴(SPR)用の金属薄膜である請求項1～26に記載の金属薄膜。

【請求項28】 自由電子金属表面を有する金属薄膜の表面を、金属表面に固定され得る官能基及び他の官能基を有する第一の有機化合物で処理して、当該第一の有機化合物を金属表面に固定し、次いで当該第一の有機化合物の金属表面に固定されていない他の官能基と化学反応をし得る第二の有機化合物を反応させて、前記第一の有機化合物と当該第二の有機化合物とを結合させることからなる有機リンカーが導入された金属薄膜を製造する方法。

【請求項29】 第一の有機化合物が、硫黄原子を含有する官能基を含有するアミノ酸又はその誘導体である請求項28に記載の方法。

【請求項30】 第一の有機化合物が、システイン又は

そのエステルである請求項29に記載の方法。

【請求項31】 第二の有機化合物が、グルタルアルデヒドである請求項28～30のいずれかに記載の方法。

【請求項32】 自由電子金属表面を有する金属薄膜の表面に、(1) 金属表面に固定され得る官能基及びポリマーと結合し得る官能基を有する有機リンカーを導入し、次いで、(2) 検出用試薬に直接結合し得る官能基若しくは検出用試薬にスペーサーを介して結合し得る官能基及び前記有機リンカーと結合し得る官能基を有するポリマーを前記有機リンカーと反応させてこれを結合させることからなる、表面が処理された金属薄膜を製造する方法。

【請求項33】 ポリマーが、ポリマーの主鎖又は側鎖にアミノ基を有するポリマーである請求項32に記載の方法。

【請求項34】 ポリマーが、アミノ糖を含有する多糖類又はポリ低級アルキレンイミンである請求項33に記載の方法。

【請求項35】 ポリマーが、キトサン又はポリエチレンイミンである請求項34に記載の方法。

【請求項36】 自由電子金属表面を有する金属薄膜の表面に、(1) 金属表面に固定され得る官能基及びポリマーと結合し得る官能基を有する有機リンカーを導入し、次いでこれに、(2) 検出用試薬に直接結合し得る官能基若しくは検出用試薬にスペーサーを介して結合し得る官能基及び前記有機リンカーと結合し得る官能基を有するポリマーを前記有機リンカーと反応させてこれを結合させ、さらに、当該ポリマーに直接又は検出用試薬に結合し得る官能基を有するスペーサーを介して検出用試薬を結合又は吸着させてなる、表面が処理された金属薄膜を製造する方法。

【請求項37】 スペーサーが、ポリマーに結合し得る官能基及び検出用試薬に結合し得る官能基を有する有機化合物である請求項36に記載の方法。

【請求項38】 検出用試薬に結合し得る官能基が、カルボキシル基又はその反応性誘導体である請求項36又は37に記載の方法。

【請求項39】 検出用試薬が、蛋白質である請求項36～38のいずれかに記載の方法。

【請求項40】 蛋白質が抗原又は抗体である請求項39に記載の方法。

【請求項41】 金属薄膜が、金、銀、銅、アルミニウム又はクロムである請求項28～40のいずれかに記載の方法。

【請求項42】 表面プラズモン共鳴 (SPR) により試料を検出、同定又は定量する際に、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定用の金属薄膜が請求項28～41のいずれかに記載の方法で予め処理されている金属薄膜を使用することを特徴とする表面プラズモン共鳴 (SPR) により試料を検出、同定又は定量する方法。

【請求項43】 表面プラズモン共鳴 (SPR) により試料を検出、同定又は定量する際に、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定用の金属薄膜を請求項28～41のいずれかに記載の方法で測定中に処理し、次いで試料を添加して測定を行うことを特徴とする表面プラズモン共鳴 (SPR) により試料を検出、同定又は定量する方法。

【請求項44】 請求項1～27のいずれかに記載の金属薄膜を使用することを特徴とする表面プラズモン共鳴 (SPR) により試料を検出、同定又は定量する方法。

【請求項45】 請求項1～19に記載の金属薄膜又はそのポリマー部分に検出用試薬を結合し得る官能基を有するスペーサーを結合させた金属薄膜に、順次又は同時に検出用試薬及び試料を添加して、検出用試薬と試料中の物質との動向を表面プラズモン共鳴 (SPR) により検出、同定又は定量する方法。

【請求項46】 検出用試薬と試料中の物質との動向が、抗原-抗体反応である請求項45に記載の方法。

【請求項47】 (1) 金属表面に固定され得る官能基及びポリマーと結合し得る官能基を有する有機リンカー、(2) 検出用試薬に直接結合し得る官能基若しくは検出用試薬にスペーサーを介して結合し得る官能基及び前記有機リンカーと結合し得る官能基を有するポリマー、及び、(3) 金属薄膜からなる表面プラズモン共鳴 (SPR) により試料を検出、同定又は定量するためのキット。

【請求項48】 さらに、(4) 検出用試薬及び必要のよりこれをポリマーに結合させるためのスペーサーを包含してなる請求項47に記載のキット。

【請求項49】 請求項1～27のいずれかに記載の金属薄膜を使用した表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ポリマーが結合した有機リンカーで表面処理された金属薄膜、それを用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置、及び、それによる試料を検出、同定又は定量する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 今日、感染症の検査や診断の分野において免疫測定法が広く利用されている。一般に、通常の感染症では体内に多量の抗体が作り出され、この抗体の有無を見分けることで診断を行っている。また、血清、尿、唾液など体液中の成分(血糖値、コレステロールなど)の値も、患者の病態を把握し治療方針を検討するうえで大切なパラメータとなっている。診断の際、試料の採取量には制約があり、頻回の採取は難しいため測定法には高い精度(再現性)と感度が要求される。しかも目的成分は、通常生体試料という複雑なマトリックス中に微量しか含まれていないため、信頼度の高い分析結果を的確に得ることは極めて重要である。

【0003】 一方、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasm

on Resonance : SPR) センサーは、金や銀などの金属薄膜表面に発生する表面プラズモン共鳴現象を検出するデバイスである。表面プラズモンとは、金属-誘電体界面に生じる電子の疎密波の一種であり、その波数は金属薄膜表面に接する数100nmまでの試料の厚さや光学特性(誘電率、屈折率)によって変化する。この変化を直接測定することは不可能なため、SPRセンサーではレーザー光を試料の反対面から当てエバネッセント波を発生させ、これが表面プラズモンと共鳴する時のレーザーの入射角度変化(SPR angle shift)を測定することで表面の状態の変化を間接的に測定するのが一般的な方法となっている。

【0004】このセンサーは、1971年にクレチュマン(Kretschmann)により光励起による表面プラズモン励起法が確立され、それから11年後になってSPRが初めてナイランダー(Nylander)らによってセンサーとしてガスセンシングに応用された例が報告された。このセンサーは試料の存在によるバルクの屈折率変化を捕らえた単純なものであったが、1990年頃までには、試料液中のアルコール濃度等を対象としたこの種のセンサーの開発がさかに行われた。

【0005】1980年代後半には、チオール、スルフィド類等の金表面に対する自己吸着の研究が行われ、カルボン酸やアミノ基など様々な官能基をもったアルキルチオール類で金表面を修飾した自己吸着性単層膜(Self-Assembled Monolayer)の研究例が報告された。1993年には、金表面の自己吸着性単層膜(Self-Assembled Monolayer)上に電荷を有するもうひとつの層を形成させた、2層構造の活性部位に抗原-抗体などの特異的な反応を示すリガンドを固定したバイオセンサーが開発され、定性、定量分析や反応プロセスの解明などに用いられるようになった(Stelzle, M., et al., J. Phys. Chem., 97, 2974-2981 (1993))。

【0006】また、この頃から小型化を目的とした光ファイバー型SPRセンサーの研究例が報告され始め、従来の光源の波長を一定にし、試料への共鳴の起こる入射角を測定する方法から、光の入射角を一定にし波長を変化させるセンサー装置が開発された。1995年以降は、SPRセンサーを利用した多くのセンシング例が報告され、特にバイオセンサーの分野でセンサーの高感度化や新規リガンド測定を目的とした数多くの研究例が報告されている。

【0007】SPR化学センサーの開発において、センシング部の金属薄膜に何らかの修飾を施すことが要求され、SPRセンサーをバイオセンサーに応用させるには、官能基を有するポリマーの金属薄膜への修飾が考えられる。金属薄膜に金薄膜を用いる場合、金へのチオール、スルフィド類の自己吸着性(Self-Assembled Monolayer)を利用する修飾法が考えられ、実際にSPRバイオセンサーにおけるセンサー表面へのリガンドの固定

化にはAu薄膜上に自己吸着したアルカンチオールをリンカーレイヤーとして、カルボキシメチルデキストラン(CMD)層を導入しそのCMD層に固定化する方法が報告されている。CMD層の役割は固定するリガンド量の増加、金薄膜への生体分子の非特異的結合防止などである。チオール、スルフィド類の修飾方法は、Claire E. Jordanらの論文(Jordan, C.E., et al., Langmuir, 1994, 10, 3642-3648)では1mMのチオールのエタノール溶液に1h、金薄膜を浸すだけで90%の吸着率という簡単なもので、吸着の評価はXPS(X線光電子分光法)やSPR角変化を見ることで可能である。

【0008】また、特表平4-501605号には、金属表面に結合する層の上にヒドロゲルなどの生適合性多孔質マトリックスの層を設けてなる検出表面についての発明が記載されており、特表平4-501606号には二官能性又は多官能性分子を用いるセンサーユニットについての発明が記載されており、また、特表平4-501607号にはセンサー表面にリガンドが結合したセンサーを用いる巨大分子の特性の決定方法についての発明が記載されている。特表平7-507865号には可逆的結合受容体を含む固定化された結合パートナーを含む固体支持体を用いて試料中の関心のある分析対象物を検出する方法及び装置についての発明が記載されている。また、WO96/10178には、自己吸着性単層膜(Self-Assembled Monolayer)上に膜形成蛋白質又は脂質を結合させた気質表面の製造方法についての発明が記載されている。

【0009】SPRセンサーは、エバネッセント波を用いて間接的に試料の状態変化を測定するデバイスであるので、測定に使われるレーザー光の通る部位と試料の存在する部位が異なるので、従来の光学センサーと比較して次のような利点がある。

1. センサー表面で起こる試料の屈折率変化がリアルタイムで検出できるので、実験の進行状況および速度論的な関係を知ることができる。
2. 測定に使用するレーザー光が試料溶液中を通過しないので、試料溶液の着色、濁りや気泡などの影響を受けにくい。
3. センサー基盤表面から1μmほどの、ごく狭い領域での光学特性が検出されるので、必要とする試料溶液の量が極めて少なくてすみ、バックグラウンドノイズの影響を受けにくい。

しかしながら、従来のセンサー表面の処理ではSPRの感度が良好ではなく、また、反応性も充分でなくリアルタイムでの測定には実用的なものではなかった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、センサー表面を様々な特性や機能を有する高分子を用いて化学修飾することで、より多くの生体成分を検出できるセンサー

デバイスを提供することを目的としている。具体的には、金属薄膜をセンサー基盤として用い、デバイスとして表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance : SPR)装置を使用して、抗原-抗体反応を利用した高感度免疫センサーを提供することを目的としている。さらに、糖質結合タンパク(Concanavalin A : ConA)を利用した新規糖質センサーを提供することを目的としている。また、本発明はこれらの新規なセンサー用の金属薄膜、それを用いたSPR装置、それを用いた試料の検出、同定又は定量方法を提供するものである。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、自由電子金属表面を有する金属薄膜の表面が、(1)金属表面に固定され得る官能基及びポリマーと結合し得る官能基を有する有機リンカー、並びに、(2)検出用試薬に直接結合し得る官能基若しくは検出用試薬にスパーサーを介して結合し得る官能基及び前記有機リンカーと結合し得る官能基を有するポリマー、で処理されてなる金属薄膜に関する。より詳細には、本発明は、当該ポリマーが、キトサン又はポリエチレンイミンなどのアミノ基を有するポリマーである前記金属薄膜に関する。

【0012】また、本発明は、前記ポリマーにさらに、検出用試薬が直接又は検出用試薬に結合し得る官能基を有するスパーサーを介して検出用試薬が結合している金属薄膜に関する。本発明の金属薄膜は、表面プラズモン共鳴(SPR)の測定用の高感度のセンサー薄膜として有用である。

【0013】また、本発明は前記金属薄膜の製造方法、これを用いた表面プラズモン共鳴(SPR)による測定方法、そのためのキット、及び、表面プラズモン共鳴(SPR)測定装置に関する。

【0014】本発明の金属薄膜の表面は、(1)一方が金属薄膜表面に固定されている有機リンカー層、(2)有機リンカー層に結合するポリマー層、(3)ポリマー層に直接又はスパーサーを介して結合する検出用試薬層からなるものである。

【0015】本発明の有機リンカー層は、金属表面に固定され得る官能基とポリマーと結合し得る官能基の間が、炭素原子、酸素原子、及び、窒素原子からなる群から選ばれる原子からなり、直鎖部分が2~20原子、好ましくは2~15原子、より好ましくは2~10原子である直鎖状若しくは分枝状又は環状の化学構造を有するものであればよく、単一の分子種であってもよいが、2種以上の分子種を用いて設計されるものであってもよい。2種以上の分子種を用いる場合には、比較的反応性に富む官能基を使用することができ、短時間で且つ安価に有機リンカー層を形成することができるので、より好ましい本発明の態様となる。

【0016】本発明の有機リンカー層を形成する金属表面に固定され得る官能基及びポリマーと結合し得る官能

基を有する有機リンカーの「金属表面に固定され得る官能基」としては、金属表面と化学結合により固定される官能基であってもよいが、吸着により固定され得る官能基であってもよい。このような官能基としてはメルカプト基、スルフィド基又はジスルフィド基のような硫黄原子を含有するものが好ましい。また、「ポリマーと結合し得る官能基」としては、使用するポリマーが含有している官能基に応じて種々の官能基を選択することができる。例えば、ポリマーがアミノ基を含有している場合には、カルボキシル基やカルボニル基などを選択することができるし、ポリマーがカルボキシル基を含有している場合には、アミノ基や水酸基などを選択することができる。本発明におけるカルボニル基は、アルデヒド基やケト基を包含するものであり、好ましくはアルデヒド基である。

【0017】本発明の有機リンカーとして単一の分子種を用いる場合には、例えば、メルカプト基、スルフィド基又はジスルフィド基のような硫黄原子を含有する官能基を有する炭素数2~20、好ましくは2~15、より好ましくは2~12の脂肪酸を使用することができる。より具体的には、例えば、11-メルカプトウンデカン酸が挙げられる。

【0018】より好ましい本発明の有機リンカーとしては、2種以上の分子種を用いて形成されるものが挙げられる。金属表面に固定される第一の分子種としては、「金属表面に固定され得る官能基」としてメルカプト基、スルフィド基又はジスルフィド基のような硫黄原子を含有する官能基を有し、かつ、第二の分子種と化学結合を形成し得る他の反応性の官能基を有する有機化合物が挙げられる。反応性の官能基としては、第二の分子種と化学結合を形成し得るものであればよく、例えば、アミノ基、水酸基、カルボキシル基などが挙げられる。反応性や入手の容易さからメルカプト基、スルフィド基又はジスルフィド基のような硫黄原子を含有する官能基を有するアミノ酸又はその誘導体が好ましく、より具体的にはシステインアルキルエステルが好ましい。アルキルエステルとしては、炭素数1~10、好ましくは1~5のアルキルエステルが好ましい。より具体的には、システインメチルエステル、システインエチルエステルなどが挙げられる。

【0019】本発明の有機リンカーを形成する第一の分子種に結合する第二の分子種としては、第一の分子種の反応性の官能基に化学結合し得る官能基を有し、次のポリマー層を形成するポリマーに結合し得る官能基を有する有機化合物であり、これらの官能基としては、例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、カルボニル基などが挙げられる。好ましい第二の分子種としては、例えば、反応性に富むカルボニル基を有する化合物が好ましく、より具体的にはグルタルアルデヒドなどが挙げられる。本発明の有機リンカーを形成する分子種として



は、種々の有機化合物の組み合わせが存在するが、好ましい組み合わせとしては、第一の分子種としてシステインメチルエステルを用い、第二の分子種としてグルタルアルデヒドを用いたものが挙げられ、このものは官能基を特別な活性化操作（例えば、カルボキシル基を活性エステルにするなどの。）をすることなく反応が進行するので好ましい本発明の態様とすることができる。

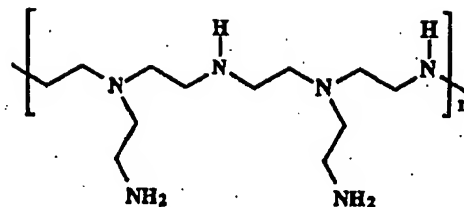
【0020】本発明の有機リンカーを金属表面に固定する方法としては、有機リンカーとなる化合物を金属に接触させることにより行うことができる。接触させる前に金属表面を水酸化カリウムなどのアルカリで洗浄しておくことが好ましい。金属表面との接触は、ジメチルホルムアミド（DMF）などの有機溶媒や水などの存在下に行うのが好ましい。次いで、必要に応じて第二の分子種を反応させることにより、有機リンカー層を形成することができる。この場合に必要に応じて、反応に関与する官能基を活性化してから行うこともできる。

【0021】本発明のポリマー層を形成するポリマーとしては、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、カルボニル基などの有機リンカー中の「ポリマーに結合し得る官能基」と結合し得る反応性の官能基を有し、かつ、検出用試薬又は検出用試薬を結合するためのスペーサーを結合し得る官能基を有するポリマーである。これらのポリマー中の「反応性の官能基」と「検出用試薬などに結合し得る官能基」とは異なる官能基であってもよいが、同種官能基であってもよい。好ましい官能基としては、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、カルボニル基などが挙げられる。有機リンカー中の「ポリマーに結合し得る官能基」がアルデヒド基などのカルボニル基の場合には、第一級アミノ基を有するポリマーが好ましい。ポリマー中の第一級アミノ基は、ポリマーの主鎖に結合するものであってもよいが、ポリマーの側鎖に結合するものが好ましい。

【0022】本発明のポリマーを例示すれば、ポリアルキレンイミンや多糖類、ポリリジンなどが挙げられるが、ポリ低級アルキレンイミンやアミノ糖を含有する多糖類が好ましい。ポリアルキレンイミンはアルキレンジアミンの重合体が挙げられ、側鎖部分に第一級アミノ基が存在している重合体が好ましいが、重合後に化学修飾により側鎖部分に第一級アミノ基を導入したものであってもよい。アルキレンジアミンとしては、炭素数2～10、好ましくは2～6のアルキレン基を有するジアミンであり、好ましくはエチレンジアミンが挙げられる。好ましいアルキレンジアミンの重合体としては、例えば、次式で示される繰り返し単位を有するポリエチレンイミンが挙げられる。

【0023】

【化1】



【0024】多糖類としては、アミノ糖を含有する多糖類が好ましく、アミノ糖が重合したものでも、アミノ糖が部分的に導入されているものでもよいが、キトサンのようにアミノ糖が重合した多糖類が好ましい。たま、多糖類にアミノ基などの反応性の官能基を導入したものであってもよい。これらのポリマーの分子量は、ポリマーの種類によっても異なるが、一般的には、1,000～1,000,000、好ましくは5,000～1,000,000、より好ましくは5,000～500,000程度である。

【0025】有機リンカーとポリマーとを結合させる方法としては、これらを溶媒の存在下に直接反応させることもできるが、反応性が充分でない場合にはこれらの官能基を活性化、例えば、活性エステル化などにより活性化させて、反応させることもできる。原料物質として、システインメチルエステル、グルタルアルデヒド及びポリエチレンイミンを用いた場合の本発明の金属薄膜の処理法を、図1に示す。金属薄膜を温めた水酸化カリウム水溶液に数回つけることで洗浄した後、L-システインメチルエステルのDMF溶液に浸すことにより図1の（1）の状態とし、これを、グルタルアルデヒド水溶液で処理して図1の（2）の状態にし、これにポリエチレンイミン水溶液を浸して図1の（3）のポリエチレンイミン膜を有するセンサープローブとすることができた。

【0026】また、原料として、システインメチルエステル、グルタルアルデヒド及びキトサンを用いた場合の本発明の金属薄膜の処理法を、図2に示す。図2では、さらに、スペーサーとしてα-ブロム酢酸が使用されている。図1に示した方法と同様な方法により、金属薄膜を洗浄した後、L-システインメチルエステルDMF溶液及びグルタルアルデヒド水溶液で処理して有機リンカー部分を調製し、これに1%キトサン水溶液を接触させることによりキトサンを固定化してセンサープローブを調製した。次いで、キトサンをα-ブロム酢酸の水酸化ナトリウム溶液でカルボキシル化して、カルボキシメチル（スペーサー部分）化されたCM-キトサンセンサープローブを調製した。

【0027】本発明の検出用試薬としては、試料中の特定の物質を検出、同定又は定量することができる試薬であって、前記ポリマーに吸着又は結合などにより固定できるものであれば特に制限はないが、カルボキシル基やアミノ基などの官能基を有するものが好ましい。好ましい検出用試薬として、蛋白質が挙げられる。より詳細には、抗原又は抗体が挙げられる。本発明の検出用試薬を



直接前記したポリマー層に固定することもできるが、固定するに当たって必要に応じてスペーサーとなる物質を用いて両者を固定することもできる。スペーサーとしては、多官能性の種々の物質を使用することができる。比較的長鎖の物質を使用することもできるが、炭素数が2～15、好ましくは2～10程度の短いものが好ましい。スペーサーとして使用される化合物としては、例えば、 $\alpha$ -ブロム酢酸、 $\alpha$ -クロロ酢酸などのハロカルボン酸、グルタル酸、アジピン酸、スベリン酸などのジカルボン酸などが挙げられる。

【0028】図3に、図1に示したポリエチレンイミン膜を有する金属薄膜にスペーサーとしてスベリン酸を用い、活性エステル化法により検出用試薬（図3中ではリガンドとして示されている。）を固定する方法を示す。図4に、図2に示したCM-キトサンセンサープローブに検出用試薬（図4中ではリガンドとして示されている。）を固定する方法を示す。図4中のEDCは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを示し、NHSはN-ヒドロキシサクシニイミドを示す。

【0029】本発明の金属薄膜に使用される金属としては、自由電子を有する金属であればよく、例えば、金、銀、銅、アルミニウム、クロムなどが挙げられる。好ましい金属は、金であるが、銀、銅、アルミニウムなども好ましい金属である。金属薄膜は金属を延ばして製造されるものであってもよく、また、基板に蒸着などの方法で形成されるものであってもよい。金属薄膜の厚さは、測定可能な厚さであれば特に制限はないが、50～1,000nm、好ましくは50～500nm、より好ましくは100～500nm程度である。

【0030】表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)装置に本発明の金属薄膜を使用する場合には、プリズムなどの基板に本発明の金属薄膜が密着されて使用される。図5に本発明の金属薄膜の調製法と、表面プラズモン共鳴装置の概要を示す。図5に示されるように本発明の金属薄膜を調製法としては、バッチ法とオールフローインジェクト法(AFI法)がある。バッチ法は、有機リンカー層、ポリマー層、検出用試薬などを形成させるための必要な物質（図5中ではA液、B液、C液として示されている。）で金属薄膜を処理して、処理された金属薄膜（センサープローブ）を調製した後、これをSPR装置にセットして試料を添加して測定する方法である。

【0031】また、AFI法は、SPR装置にセットされた金属薄膜に順次、処理溶液を金属薄膜に流すことにより、セットされた金属薄膜を所望の状態に処理するものである。より詳細には、図5に示されるように、HPLC用のポンプなどのポンプにより常時緩衝液など（例えば、ランニングバッファー(pH7.4 10mM HEPES Buffer Saline)/T

ueen)を、流速が0.1～1.0、好ましくは0.2～0.4ml/minで流しておき、必要な時に各反応試薬を含有する溶液をインジェクターから注入することで、金属薄膜（センサープローブ）に供給させることにより必要な処理を行うことができる。そして、この間測定を継続することも可能であり、金属薄膜の測定面の反対側で生起している反応を、反応系に直接光やマイクロ波などの測定線を照射することなく反応系を測定することができる。

【0032】AFI法は、測定を継続しつつ金属薄膜の表面を処理することができるので、表面の状態をリアルタイムで把握することができる。また、金属薄膜の表面に固定された検出用試薬と試料中の物質との相互の動向（化学反応などの）を逐次測定し観察することができる。本発明はバッチ法及びAFI法のいずれの方法をも包含するものである。

【0033】材料に目的とする性能、機能を付与するためには材料表面を分子レベルで設計し機能特性をもたせることが重要となってくる。そのため、今日の臨床化学分野における抗原-抗体反応や、セルレセプター認識を用いた生体物質のセンシングにおいてそのセンサー材料表面及び、生体物質間の相互作用を含めた反応プロセスの理解は大切な課題となっている。

【0034】本発明では、様々な官能基を有する高分子を用いてセンサー表面を構築することで、幅広い物質の固定化、検出に利用できるセンサープローブを構築することを目的とした。具体的には、金薄膜をセンサー基盤として用い、デバイスとして表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)装置を使用して、センサー表面の設計を行った。

【0035】より具体的には、抗原-抗体反応を利用した高感度免疫センサーを開発するために、タンパク質を固定化するに当たって、金表面を修飾する膜として、異なる官能基を有する高分子であるポリエチレンイミン(polyethyleneimine(PEI))、及びキトサン(chitosan)に着目した。PEI膜は膜中に存在する一級アミンを、キトサン膜はカルボキシル基を活性化させて、タンパク質中のアミノ基とバインディングサイトを持たせ、そこに抗原を化学結合させてセンサー膜を作製した。本発明では、この作製方法として、従来から行われているバッチ法の他に、すべての試薬をフロー系に導入して固定化するオールフロー型固定化法も開発した。作製したセンサー膜に、抗体が特異的に結合した際のSPRアングルスフトによりその定量を行った。

【0036】また、糖質結合タンパク(Concanavalin A: ConA)を利用した新規糖質センサーの開発においては、まず、糖質としてグルコースを測定対象とした。ConAの特性として、pH7付近でグルコースとの4つのバインディングサイトを持っているためグルコースに対する吸着性は高い。しかし、あらかじめConAとグ

ルコースを混合し、バインディングサイトがいくつかグルコースと結合したものを作用させると、その選択的吸着性は低下し、この変化は、ConAの濃度を一定とすれば、混合するグルコース濃度に対応してくると思えた。この特性を利用し、Au表面をグルコースユニットで修飾してやることで、そこに吸着するConAの濃度から逆にグルコース濃度の測定を行った。

【0037】本発明の方法は、特にポリマー層に直接又はスペーサーを介して固定された抗原又は抗体と、試料中の抗体又は抗原との反応を測定するのに有利な方法である。例えば、抗体タンパク質を多量に固定化し、高感度に検出するため、金属表面を修飾する膜材としては、異なる官能基を有する高分子であるポリエチレンジアミン(PEI)、及びカルボキシメチル化キトサン(CM-chitosan)が特に好ましい。PEIは膜中に存在する一級アミンを、CM-chitosanはカルボキシル基を活性化し、抗体と特異的に反応するリガンドを化学結合させてセンサープローブ表面を構築した。

【0038】本発明ではこれらの表面を作製する際、従来から行われているパッチ法に加え、すべての試薬をフロー系に導入して固定化するオールフローインジェクション(AFI)法も検討した。作製したセンサープローブを利用して、具体的には、プロテインA-ヒト免疫グロブリンG(hIgG)、抗ヒト免疫グロブリンG(anti-hIgG)-ヒト免疫グロブリンG(hIgG)系におけるSPR応答を検討した。

【0039】今回の実験に使用したSPRセンサー(DKK製)は、図5に示すフロースルーのシステムが実行できるものである。AFI法により実験を行う場合には、HPLC用のポンプによって常時ランニングバッファー(pH7.4 10mMHBS(HEPES Buffer Saline)/Tween)を流速0.2~0.4ml/minで流しておき、各試料溶液をインジェクターから注入することで、SPR装置中のセンサープローブと接触させ、そのデータをコンピューターによって出力している。

【0040】次に本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。本発明のより具体的な説明において使用する略号を、以下にまとめて示しておく。

【0041】化合物

BSA; ウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin)。

BS3; スベリン酸ビス(スルホサクシニミドイル)(Bis(sulfosuccinimidyl) suberate)。

CAP; セルロースアセテートフタレート(Cellulose acetate phthalate)。

CM-chitosan; カルボキシメチルキトサン(Carboxymethylatedchitosan)。

EDC; 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)。

HBS; HEPES緩衝液(HEPES Buffer Saline)。

hIgG; ヒト免疫グロブリンG(human immunoglobulin G)。

NHS; N-ヒドロキシサクシニイミド(N-Hydroxysuccinimide)。

PEI; ポリエチレンジアミン(Polyethylene imine)。

【0042】溶媒

AcOH; 酢酸(Acetic Acid)。

DMF; N,N-ジメチルホルムアミド(N,N-Dimethylformamide)。

EtOH; エタノール(Ethanol)。

i-PrOH; イソプロパノール(Isopropanol)。

【0043】まず、金薄膜を70℃ほどに温めた1MKOH水溶液に数回つけることで洗浄した後、5mM L-システインメチルエステルのDMF溶液に、24時間浸すことにより、図1の(1)の状態とした。これを、5%グルタルアルデヒド水溶液で2時間処理して図1の(2)の状態とし、次いで2%PEI水溶液に2時間浸し図1の(3)で示されるPEI膜センサープローブを得た。

【0044】このようにして調製されたセンサープローブの有機リンカー部分の表面構造は、一部のグルタルアルデヒドが2分子のシステインのアミノ基と結合して2個のアルデヒド基を消費した状態のものなどがあり、分子が金属表面に規則正しく整列している自己吸着性単層膜(Self-Assembled Monolayer)の状態とは異なる状態を形成しているものと考えられる。詳細な金属表面の状態はXPSなどの表面分析を利用しその厚さを測定することにより把握することができるであろう。

【0045】次に、作製したプローブをSPR装置にセットし、pH7.4 HBS T/バッファーによるベースラインが安定した後、膜中に存在する未反応のグルタルアルデヒドを0.1M グリシン溶液をインジェクトすることでブロックした。その後、PEI膜中の一級アミンをスペーサーであるBS3で活性化させ、0.5mg/ml BSAを固定化した時の結果を図6に示し、次いで、0.1mg/ml hIgGを添加した時の結果を図7に示す。

【0046】図6及び図7は、SPRの測定結果であり、横軸に時間(分)、縦軸にレスポンス(アーク秒(1度は3600アーク秒))を示す。図6中の、(1)はpH7.4 HBS T/バッファーを添加した時点を、(2)はBS3を添加した時点を、(3)は0.5mg/mlのBSAを添加した時点を、(4)はグリシンpH3を添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点でのレスポンス $\Delta\theta$ は604アーク秒であった。図7中の、(1)はpH7.4 HBS

T/バッファーを添加した時点を、(2)はBS3を添加した時点を、(3)は0.1mg/mlのhIgGを添加した時点を、(4)はグリシンpH3を添加した時点をそれぞれ示している。hIgGを添加した時点でのレスポンス $\Delta\theta$ は150アーク秒であった。

【0047】次に、オールフローインジェクト法(AFI法)による金属薄膜の処理を検討した。金薄膜を洗浄した後、直接SPR装置にセットし、そこからすべての試薬をフロー系に導入して固定化した。即ち、10mM L-システインの水:エタノール1:4溶液、10%グルタルアルデヒド水溶液、1%PEI水溶液を順にインジェクトしてPEI膜プローブを作製し、BSAを固定化した。結果を図8及び図9に示す。図8中の、(1)はpH7.4 HBS T/バッファーを添加した時点を、(2)は10mM L-システインを添加した時点を、(3)は10%グルタルアルデヒドを添加した時点を、(4)は1%PEIを添加した時点をそれぞれ示している。

【0048】図9中の、(a)はpH7.4 HBS T/バッファーを添加した時点を、(b)は1mMのBS3を添加した時点を、(c)は500 $\mu$ g/mlのBSAを添加した時点を、(d)はグリシンpH3を添加した時点を、(e)はpH8.5で0.1Mのエタノールアミンを添加した時点をそれぞれ示している。(d)のグリシンを添加した時点でのレスポンス $\Delta\theta$ は静電的相互作用に起因するもので334アーク秒であり、共有結合による相互作用に起因するものが1130アーク秒であった。

【0049】次に、PEI膜センサープローブ表面への非特異的吸着の抑制について検討した。センサーを作製する際、体液中に存在する多種のタンパク質のセンサー膜表面への非特異的吸着は、検出感度やその選択性を低下させる主な原因として指摘されている。前記した実験においても、PEI膜表面にBSAを接触させた時、全吸着量の内の1/4から1/3程度の非特異的吸着(グリシン/塩酸pH3.0を接触させた時に脱離した分)が見られた。これは、膜中に多数残存するアミンがプロトン化することで持つプラスチャージによるBSAとの静電的相互作用が主な原因であると考えられる。

【0050】そこで、タンパク質をPEI膜プローブに固定化する際、pH7.4 HBST/バッファーの代わりにpH5.3酢酸バッファーを使用し反応時のpHを変化させた時の結果を図10に示す。図10中の、(1)はpH5.3酢酸バッファーを添加した時点を、(2)はスパーサーのBS3を1mM添加した時点を、(3)は0.5mg/mlのBSA溶液を添加した時点を、(4)は0.1Mのグリシン(pH3.0)を添加した時点をそれぞれ示している。グリシンを添加した時点でのレスポンス $\Delta\theta$ はそれぞれ860及び620アーク秒であった。

【0051】また、pH7.4バッファーで、BS3をスパーサーとして用いずに、膜中のアミノ基を100mMグリオキシル酸(Glyoxylic Acid)と反応させカルボキシル化し、膜全体のチャージバランスをとり、これを0.4M EDC/0.1M NHS 1:1混合溶液で活性化した後、BSAを固定化した際の結果を図11に示す。図11中の、(1)はpH7.4 HBSバッファーを添加した時点を、(2)は0.4MEDC/0.1MNHSを添加した時点を、(3)は0.5mg/mlのBSA溶液を添加した時点を、(4)は0.1Mのグリシン(pH3.0)を添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点でのレスポンス $\Delta\theta$ は1211アーク秒であり、グリシンを添加した時点でのレスポンス $\Delta\theta$ は673アーク秒であった。

【0052】この結果、反応時のpHやセンサープローブ表面のチャージバランスを変えることにより、BSAの非特異的吸着を減少させることはできなかった。BSAなどのタンパク質は、全体としてプラスかマイナスのどちらかの電荷をもっていることが多いが、各分子内にはプラスチャージとマイナスチャージの両方の部位をもっているため、pHの変化や全体としてプローブ表面のチャージのバランスをとってみても、タンパク質分子中の各部位すべてを膜表面に吸着しにくい状態にするのは困難である。タンパク質の種類により、非特異的な吸着を防ぐ最適なpH、及びチャージ状態は決まってくるであろうが、血清中など多種のタンパク質が存在する中でPEI膜免疫センサープローブとして測定する際、pHやチャージバランスを変えての測定は全く意味を持たない。

【0053】そこで、チャージを持つ膜中の未反応のアミノ基どうしを、グルタルアルデヒドで架橋することで不活性にしてチャージを抑制すると共に、残ったアルデヒド基による活性部位の増加を考えた。このプローブの活性化部位に検出する抗体と特異的に反応するリガンドを固定化し、これをPEI膜センサープローブとした。この反応を模式化して図12に示す。

【0054】以上の実験から、PEI膜センサープローブの基礎特性として次のように考えられる。アミノ基を持つリガンドの固定化が行えたことから、PEI膜センサープローブの作製が従来から行われているバッチ法に加えて、すべての試薬をフロー系に導入して作製するオールフローインジェクト(AFI)法でも行えることが確認できた。フロー系による試料と表面との接触時間は10分程度であるので、図1に示す反応はすべてがこの時間内で進行することがわかった。AFI法は、これまでに確立されている作製に数十時間かかる他のセンサープローブと比較し、簡便、迅速なプローブの作製方法として有用な方法と考えられる。バッチにより作製したPEI膜プローブとフローによるプローブのBSAの固定

化量を比較すると(図6及び図8、図9)、フロー系の方が2.8倍大きなレスポンスとして検出されている。しかし、BSA固定化のための活性剤であるBS3の応答は、フロー系の方が小さくなっており、BSAの固定化量と逆になっている。作成した2つのプローブの表面構造に何らかの違いがあることに起因していると考えられる。

【0055】また、問題となるPEI膜表面へのタンパク質の非特異的吸着量を小さくするため、可能なかぎり高い濃度のBS3およびEDC/NHSを接触させて、膜中の官能基を活性化させることや、余ったアミノ基を十分にブロックしていく必要がある。タンパク質の吸着の少ない物質として知られている、エーテル結合を多く含んだエチレングリコールユニットを持つ試薬を膜表面の設計の際に導入することも1つの方法として考えられる。

【0056】次に、センサープローブのアプリケーションとして、PEI膜中のバイディングサイトに抗hIgGおよびprotein Aを結合させ、これらに高い特異性と強い結合をもつ人間の免疫グロブリン抗体、hIgGを濃度を変化させて接触させたときのレスポンスをそれぞれ測定し、hIgGの定量を行った。また、protein Aとの弱い結合性をもつマウスIgG、全く結合性を示さないチキンIgG(chicken-IgG)を接触させることでプローブ表面へのタンパク質の非特異吸着量について検討した。測定に用いた8種類のプローブを図13にまとめる。

【0057】まず図13のNo. 8のプローブを用いて測定を行った時のhIgG検出のリアルタイムプロットを図14に示した。図14中の、(1)はHBS/NHSバッファーを添加した時点を、(2)はEDC/NHSを添加した時点を、(3)は200 $\mu$ g/mlの抗hIgGを添加した時点を、(4)はエタノールアミンを添加した時点を、(5)はグリシンを添加した時点を、(6)は0.1 $\mu$ g/mlのhIgGを添加した時点を、(7)は1.0 $\mu$ g/mlのhIgGを添加した時点をそれぞれ示している。

【0058】バッファーが定流している状態でEDC/NHSをインジェクトして(図14の(2)の時点)、膜中のカルボキシル基を活性化し、抗hIgGを接触させたところ、SPRアングルシフトで、2100 arc secondほどの固定化量がみられた。図14の(4)、(5)の時点で、pH8.5エタノールアミン、pH3.0グリシン溶液により、チャージで吸着している抗hIgGを脱離させると共に、残った膜中の活性化部位をブロックした。ここまでで、hIgG測定のためのセンサープローブの作製が完了し、hIgGを濃度を変化させて膜に接触させ、得られるレスポンスを検出した。まず、0.1 $\mu$ g/ml hIgGをインジェクトした結果、ほとんど検出されなかったため、塩酸を

流して膜の状態を戻し、10倍の濃度の1 $\mu$ g/mlを接触させたところ、288 arc secondのレスポンスが検出された。その後、60、160、再び60 $\mu$ g/ml hIgGを順にインジェクトした結果、それぞれの濃度に対応したレスポンスを得ることができた(図15参照)。

【0059】それぞれのプローブごとに得られたデータに基づき検量線を作成し、活性化方法による違い(図13のNo. 2-No. 6、No. 4-No. 8)、および作製方法による違い(図13のNo. 5-No. 6、No. 7-No. 8)について検討を行った(図16及び図17参照)。図16中の左側はBS3で活性化したバッチ法によるものであり、右側はEDC/NHSで活性化したバッチ法によるものであり、黒三角印及び白四角印はプロテインA-hIgG系を示し、黒丸印及びバツ印は抗hIgG-hIgG系を示す。図17中の左側はEDC/NHSで活性化したバッチ法によるものであり、右側はEDC/NHSで活性化したAFI法によるものであり、白四角印及び白丸印はプロテインA-hIgG系を示し、バツ印及び白菱形印は抗hIgG-hIgG系を示す。また、非特異抗体の吸着量についてもNo. 1、5、6チップを比較することで検討した(図18参照)。図18中のグレーの棒はhIgGを示し、斜線の棒はマウスIgGを示し、横線の棒はチキンIgGを示す。いずれの濃度も90 $\mu$ g/mlである。PEI膜中のアミノ基をBS3を用いて活性化した結果と、グリオキシル酸でカルボキシル基にし、膜表面全体のチャージバランスをとり、これをEDC/NHSで活性化した場合について図16で比較検討した。

【0060】その結果、プロテインA-hIgG系において、カルボキシル基を導入した表面の方が得られる検量線の直線性が高いうえに、検出感度も増加することがわかった。これは、図18の非特異抗体の吸着量をみても、プローブNo. 5のEDC/NHS活性の方が、No. 1のBS3活性と比較してマウス(Mouse)、チキン(Chicken)-IgGともに、hIgGの量と相対的にみて吸着量がおさえられ、検出精度が高くなった結果とも一致している。前記したBSAの固定化の実験においては、PEIにカルボン酸を導入することでBSAの非特異的吸着量は増加したが、今回の抗原-抗体反応においては、等電点などタンパク質の複雑な構造の違いにより、マウス(Mouse)、チキン(Chicken)-IgGの膜への非特異吸着は膜にマイナスのチャージを導入することで防げることがわかった。

【0061】図17で、このカルボン酸を導入した系についてAFI法、バッチ法と分けて検量線を作製した。その結果、フロー系で作製したプローブについても、バッチ法と同等の検出感度、直線性を得られた。また、図18に示す様に、AFI法で作製したPEI膜はバッチ法と比較して非特異的吸着が減少した。これはチップ表

面の膜構造 (アミノ基の配向性など) に何らかの違いがあるためだともわれる (図19参照)。例えば、19図に示されるように吸着ホモポリマー型や、投錨型ポリマー (terminally-anchored) 型などが考えられる。AFI法による金属、特に金基盤表面へのタンパク質の固定化はこれまでに報告例がなく、簡便、迅速かつ再現性のよいセンサープローブの作製法として有用な方法であると考えられる。これらの結果より、タンパク質の非特異的吸着の少ない膜表面の設計には膜表面の電荷の制御が1つの重要なファクターであることがわかり、膜材や作製方法をさらに検討することで、検出特性や検出能はさらに改善される。

【0062】また、タンパク質は一般に高分子表面に接触すると徐々に接点を増やし、そのコンフォメーションを変化させることが有り、自然な状態の性質が損なわれる。さらに、その活性サイトが表面との接点になっていたり、立体的に障害されるように配置されても活性を落としてしまう。リガンド固定化の際にその配向性を制御していくことも、検出精度の増加につながる。

【0063】次に、アミノ糖を含有するポリマーを膜に使用することについて検討した。キチン (chitin) はポリアミノ糖であり、キトサン (chitosan) はキチンのアセチル基が部分的に加水分解されたもので、D-グルコースアミンの $\beta$ -(1,4)-重合体である。chitin、chitosanは甲殻類、昆虫類の組織支持体であるため、生体との親和性が高く、酵素によって生体内で分解される。このことを利用して、医療材料として吸収性縫合糸や人工皮膚などに用いられている。また、免疫活性を有すること、タンパク質などの体液中成分の吸着が少ないことからドラッグデリバリーシステムの担体としても利用されている。さらにchitosanの誘導体は、アシル基の長さにより光学異性体の選択的吸着性があるので、HPLCでラセミ混合物の分離に用いられている。

【0064】本発明では、キトサンの高い生体適合性と、PEI膜センサープローブで問題となったタンパク質の非特異的吸着のない性質を利用して、キトサン膜免疫センサープローブの作製を試みた。まず、PEIの時と同様に、金薄膜を70℃ほどに温めた1M、KOH水溶液に数回つけることで洗浄した後、5mM L-システインメチルエステルのDMF溶液に24時間浸した後、これを5%グルタルアルデヒド水溶液に2時間浸けた。これに1%キトサン水溶液を24時間接触させることでキトサンを固定化した。次に、キトサン中のOH基を2Mの $\text{BrCH}_2\text{COOH}$ /1M NaOH溶液に12時間浸すことでカルボキシル化し、カルボキシメチル化キトサン (CM-chitosan) センサープローブを作製した (図2参照)。

【0065】PEI膜プローブによる測定と同様に、作製したプローブをSPR装置にセットし、pH7.4 HBS-T/バッファーによるベースラインが安定した

後、膜中の-COOH基を、0.4M EDC/0.1M NHS 1:1混合溶液をインジェクトして活性化した後、0.5mg/ml BSAを固定化した時の結果を図20に示す。図20中の、(1)はpH7.4 HBS-T/バッファーを添加した時点を、(2)は0.4MEDC/0.1MNHSを添加した時点を、(3)は0.5mg/mlのBSA溶液を添加した時点を、(4)はエタノールアミンを添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点のレスポンス $\Delta\theta$ は150アーク秒であった。

【0066】キトサン膜に $\text{BrCH}_2\text{COOH}$ を浸すことで膜中の-OH基を-COOH基にし、これを活性化した後、BSAを固定化したところ、図20に示すように150アーク秒のレスポンスが得られた。その際、BSAの固定化量はCM-chitosan膜プローブ中に存在するCOOH基の量に依存すると考えられる。そこで、キトサンをカルボキシル化する際に、バッチ法によりプローブ表面で行うものから、あらかじめカルボキシル化率の高いCM-chitosanを合成し、これを表面に固定化することでリガンドの固定化量増加を試みた。

【0067】キトサン1.0g、ラウリルスルホン酸ナトリウム0.1gを45%NaOH水溶液70ml中にゆっくり加え、4℃に保ちながら溶解するまで1時間ほど攪拌した。これを-20℃で、12時間ほど放冷した後、i-PrOH125ml、 $\text{ClCH}_2\text{COOH}$ 28.4gを加えて72時間反応させた。続いて、2MHC1を加えていき、白色の結晶を9.8727g得た。次に、この結晶0.5gを10%NaOH水溶液20mlに溶解させた後、4MHC1をpH1になるまで加えた。これに、大量のアセトンを加えることで結晶を析出させ、吸引ろ過により0.7gのCM-chitosanを得た。

【0068】前記の方法で合成したCM-chitosanを前と前記したスキームと同様な方法でセンサープローブに固定化しカルボキシル基を活性化したが、この系ではBSAを固定化することはできなかった。スキーム中に反応のいかないステップがあると考えられる。グルタルアルデヒドの固定化までは反応が進むことがわかっているため、CM-chitosanをモノレイヤーに固定化する反応がネックになっていると予想された。CM-chitosanを合成する際、糖のアミノ基もカルボキシル化されるため、ポリマー中の-NH<sub>2</sub>基の量が少なくなっていること、-NH<sub>2</sub>基がポリマーの主鎖に直接ついているため自由度がなく、反応性が低いことが原因になっていると思われる。そこで、別の反応経路に変えてキトサン膜センサープローブの作製を行った。

【0069】金薄膜を洗浄した後、 $10^{-3}$ MのHS-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>COOH/EtOH溶液に2時間、0.4

M EDC/0.1M NHSの1:1混合溶液に40分浸した後、先程の2%CM-chitosan水溶液に2時間つけることで、chitosan膜センサープローブIIの作製を行った。このプローブを用いて、膜中の-COOH基を、0.4M EDC/0.1M NHS 1:1混合溶液で活性化し、200 $\mu$ g/ml hIgGを固定化した後、500 $\mu$ g/mlのBSAの膜への吸着を測定した結果を図21に示す。図21中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はEDC/NHSを添加した時点を、(3)は0.2mg/mlのIgG溶液を添加した時点を、(4)はエタノールアミンを添加した時点を、(5)は500 $\mu$ g/mlのBSAを添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点のレスポンス $\Delta\theta$ は720アーク秒であった。

【0070】反応系を変えることで、CM-chitosanを基盤に固定化することができた。キトサンの性質から、CM-chitosan膜プローブではPEI膜にみられたタンパク質(BSA)の膜への非特異的吸着は、ほとんどみられなかった。それを確かめるため、プローブにキトサンおよびCM-chitosanを固定化し、それらを活性化しないでBSAを接触させた時の様子を図22及び図23に示す。図22中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はグリシン/HCl(pH3)を添加した時点を、(3)は500 $\mu$ g/mlのBSAを添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点のレスポンス $\Delta\theta$ は50アーク秒であった。図23中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)は500 $\mu$ g/mlのBSAを添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点のレスポンス $\Delta\theta$ は100アーク秒であった。

【0071】キトサンはその性質のとおり非特異吸着はほとんどみられなかったが、その誘導体であるCM-chitosanも、膜中に多量のカルボキシル基が存在しているにも関わらず、500 $\mu$ g/mlというかなり高濃度のBSAを接触させた時のレスポンスは100アーク秒と非常に小さな値となった。これによりPEI膜プローブ作製課程で行ったプローブ表面の電荷のブロックはCM-chitosan膜では必要ないことが確認できた。

【0072】次に、PEIと同様にAFI法によるキトサン膜センサープローブの調製を行った。PEI膜センサープローブの時と同様に金薄膜をSPR装置にセットし、そこからすべての試薬をフロー系に導入して固定化するオールフロー系固定化法を試みた。結果を図24に示す。図24中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はモノレイヤーのエタノール溶液を添加した時点を、(3)はEDC/NHSの0.2M/0.05Mを添加した時点を、(4)は1

%CM-キトサンを添加した時点を、(5)は0.5mg/mlのBSAを添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点のレスポンス $\Delta\theta$ が観測された。

【0073】CM-chitosan膜センサープローブの作製をフロー系で試みた結果、フローで行った系でもBSAを固定化することができたが、そのレスポンスは僅かであった。これは、フロー系での各試薬と膜表面との接触時間が約10分であることから、時間的に反応が充分ではないステップがあると考えられる。フローでのPEI膜の作製が行えることから、CM-chitosanをモノレイヤーに固定化する反応がネックになっていると予想され、これはおそらく問題となった固定化部位であるCM-chitosan中の-NH<sub>2</sub>基がポリマーの主鎖に直接ついているため自由度がなく、反応性が低いことが原因になっていると考えられる。ポリマーの主鎖ではなく、側鎖に自由度の大きなアミノ基などの官能基を有するようにポリマーを修飾することにより、より反応性のあるポリマーとすることができると考えられる。

【0074】これまでの実験結果より、合成したCM-chitosanを基盤に固定化したセンサープローブの作製がバッチ法で行え、アミノ基を持つリガンドの検出がSPRシグナルとして確認できた。その際、PEI膜プローブにみられたタンパク質(BSA)の膜への非特異的吸着は、ほとんどみられなかった。このプローブのAFI法へ適用することもできるが、-NH<sub>2</sub>基がポリマーの主鎖に直接ついているため自由度がなく、反応性が低いことが原因となって、バッチほうに比べて充分な反応性がみられないことがある。CM-chitosan合成にもう1ステップ加えて、アミノ基に親水性の高いスパーサーを導入し、モノレイヤーとの結合部位の自由度を高めることによって、この問題は解決できると考えられる。

【0075】また、CM-chitosanの水溶性が低いことも、プローブを作製するうえで問題点のひとつになっている。一般にキトサンは数十万の分子量をもっており、これが小さくなるにつれて水溶性が増していくことがわかっている。分子量の小さいキトサンを使用して、CM-chitosanを合成することで、基盤に固定化されやすくなると予想される。その時の反応条件として酸酸性が高すぎると、アミノ基の求核性がプロトン化することで失われ反応が進まなくなるので、中性よりやや塩基性側で反応を行うのが適当だと考えられる。

【0076】さらに、本発明は抗原-抗体反応を利用した高感度免疫センサーを提供する。CM-chitosanセンサープローブのアプリケーションとして、PEI膜と比較するためバイndingサイトにプロテインAを結合させ、これらに高い特異性と強い結合力をもつ人間の免疫グロブリン抗体、hIgGを濃度を変化させ



て接触させたときのレスポンスをそれぞれ測定し、h I g G の定量を行った。No. 5、6 の P E I 膜プローブの結果と合わせた検量線を図 25 に示す。図 25 中の丸印は P E I 膜プローブを用いた A F I 法によるものであり、四角印は P E I 膜プローブを用いたバッチ法によるものであり、三角印は C M - キトサン膜プローブを用いたバッチ法によるものである。

【0077】また同様に、プロテイン A との弱い結合性をもつマウス - I g G、全く結合性を示さないチキン ( chicken ) - I g G を接触させることでプローブ表面へのタンパク質の非特異吸着量について検討し、P E I 及び市販品である C M D 膜プローブと比較したデータを図 26 に示す。図 26 中のグレーの棒は h I g G を示し、斜線の棒はマウス I g G を示し、横線の棒はチキン I g G を示す。いずれの濃度も  $90 \mu\text{g}/\text{ml}$  である。

【0078】P E I 膜と比較し応答感度は  $1/4$  程度に低下したが、この膜は以前に考察したように非特異的抗体の吸着が全くみられず、市販品である C M D 膜プローブと比較しても、高い検出精度を得ることができた。これまでに、オリゴエチレンモノレイヤーで表面を被服されたプローブは、タンパク質の非特異的な吸着を抑制することが報告されており、同様な傾向が C M - c h i t o s a n、C M D 膜プローブでもみられた。

【0079】これまでは、タンパク質の吸着性を電荷と親疎水性の点から論じてきたが、この特異的な性質を表面付近の水と膜の相互作用という観点から考えてみたい。水は生命に不可欠な溶媒としての重要性から、また  $4^{\circ}\text{C}$  付近で最も密度が高くなり、他の液体に比べて著しく大きな比熱を持つといった特異的な性質のため、古くから非常によく研究されてきた。この水の性質は、分子同士が互いに水素結合することにより形づくられる「構造」に由来するが、その構造に関しては未解決の問題が多く残されている。また、タンパク質や高分子をはじめとする水溶性高分子が、水との相互作用によってその構造や性質、機能に大きく影響を受けることや、逆に高分子の水和水や高分子ゲル中の水が、運動性、凍結-融解挙動等の性質においてバルク水と異なることが知られている。一般に、高分子表面の水は、自由水とポリマーに束縛された水に分類することができ、束縛の強さによって、ポリマー表面に形成される水層の状態が異なってくる。この表面水層の状態が、タンパク質の表面への吸着性を決定する要因の 1 つであるといわれている。

【0080】ポリエチレングリコール、C M - c h i t o s a n、C M D の化学構造に共通する点として、いずれもエーテル結合を分子内部に持っており、この部位により膜表面に形成される水層が、タンパク質の非特異的な吸着を抑制するのではないかと予想される。

【0081】本発明は、P E I 膜センサープローブの作製法として従来のバッチ法に加え、オールフローインジ

ェクト ( A F I ) 法を提供したものであり、A F I 法で作製した P E I 膜は、バッチ法と同等の高い応答感度が得られ、非特異抗体の吸着量も小さかった。また、タンパク質の非特異的吸着の少ない膜表面の設計には膜表面の電荷の制御が 1 つの重要なファクターであることがわかり、膜材や作製方法をさらに検討することで、検出特性や検出能はさらに改善されることが考えられる。さらに、A F I 法で作製した P E I 膜は、バッチ法と比較して非特異的吸着が少ないうえ、検出精度も高くなることがわかった。これはプローブ表面の膜構造 ( アミノ基の配向性など ) に何らかの違いがあるためだともみられる。A F I 法による、金属表面へのタンパク質の固定化はこれまでに報告例がなく、簡便、迅速かつ再現性のよいセンサープローブの作製法として有用な方法と考えられる。

【0082】本発明の C M - c h i t o s a n 膜に基づくセンサープローブの検討では、A F I 法及びバッチ法による作製を行い、プロテイン A を固定化して h I g G を検出した。その結果、P E I 膜の場合と比較して応答感度は  $1/4$  程度に低下したが、C M - c h i t o s a n 膜は非特異的吸着が全くみられなかった。これらの結果より、タンパク質の非特異的吸着の少ない膜表面の設計には膜表面の電荷の制御が 1 つの重要なファクターであることがわかり、膜材や作製方法をさらに検討することで、検出特性や検出能はさらに改善されることが考えられる。

【0083】本発明のセンサープローブの効果をより明確にするために、公知のデキストラン膜センサーチップとの比較試験を行った。デキストラン膜は既にカルボキシメチル化されているので、本発明の P E I 膜と同様に  $0.4 \text{ MEDC} / 0.1 \text{ MNHS}$  の  $1:1$  混合液で活性化して両者にプロテイン A を固定した。これに、濃度  $0.1, 1.0, 10, 45, 90, 200 \mu\text{g}/\text{ml}$  の h I g G をそれぞれのセンサーに流した。本発明の P E I 膜の経時変化を図 27 に示す。また、これらの実験で得られた両者の検量線を図 28 に示す。図 28 の左側が本発明の P E I 膜のものであり、右側はデキストラン膜のものである。

【0084】この結果、図 28 からわかるように、本発明の P E I 膜では h I g G 濃度が  $0.1 \sim 90 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、デキストラン膜では  $10 \sim 200 \mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲ではほぼ直線性を示すことがわかり、本発明の P E I 膜のほうがその応答感度において約 20 倍も大きく、そのために検出限界も低くなっている。このように、本発明のポリマー膜、特に P E I 膜は、比較的簡単な化学構造を有するポリマーを使用することにより、簡便で、安価な、しかも高感度のセンサープローブであることがわかる。

【実施例】次に実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。



## 【0085】実施例1

金薄膜を70℃ほどに温めた1M KOH水溶液に数回つけることで洗浄した後、5mM L-システインメチルエステルのDMF溶液に、24時間浸すことにより、図1の(1)の状態とした。これを、5%グルタルアルデヒド水溶液で2時間処理して図1の(2)の状態とし、次いで2%PEI水溶液に2時間浸し図1の(3)で示されるPEI膜センサープローブを得た。

## 【0086】実施例2

実施例1で作製したプローブをSPR装置にセットし、pH7.4 HBS T/バッファーによるベースラインが安定した後、膜中に存在する未反応のグルタルアルデヒドを0.1M グリシン溶液をインジェクトすることでブロックした。この後、PEI膜中の一級アミンをスパーサーであるBS3で活性化させ、0.5mg/ml BSAを固定化した時の結果を図6に示し、次いで、0.1mg/ml hIgGを添加した時の結果を図7に示す。

## 【0087】実施例3

実施例2において、タンパク質をPEI膜プローブに固定化する際、pH7.4 HBS T/バッファーの代わりにpH5.3酢酸バッファーを使用し反応時のpHを変えて実施例2と同様に行った。結果を図10に示した。

## 【0088】実施例4

また、実施例2においてpH7.4 bufferで、スパーサーとしてBS3の代わりに100mM グリオキシ酸ル(OHC-COOH)と反応させカルボキシル基を導入し、膜全体のチャージバランスをとり、これを0.4M EDC/0.1M NHS 1:1混合溶液で活性化した後、BSAを固定化した。この結果を図11に示した。

## 【0089】実施例5

スパーサーによりカルボキシル基を導入したセンサープローブに緩衝液を流し、バッファーが定流している状態でEDC/NHSをインジェクトして、膜中のカルボキシル基を活性化し、抗hIgGを接触させたところ、SPRアングルシフトで、2100arcsecondほどの固定化量がみられた。次いで、pH8.5エタノールアミン、pH3.0グリシン溶液により、チャージで吸着している抗hIgGを脱離させると共に、残った膜中の活性化部位をブロックした。ここまでで、hIgG測定のためのセンサープローブの作製が完了した。hIgGを濃度を変化させて膜に接触させ、得られるレスポンスを検出した。1μg/mlを接触させたところ、288arcsecondのレスポンスが検出された。その後、60、160、再び60μg/ml hIgGを順にインジェクトした結果、それぞれの濃度に対応したレスポンスを得ることができた。結果を図14及び図15に示した。

## 【0090】実施例6

それぞれのプローブごとに実施例5と同様にして得られたデータに基づき検量線を作成し、活性化方法による違い(図13のNo. 2-No. 6, No. 4-No. 8)、および作製方法による違い(図13のNo. 5-No. 6, No. 7-No. 8)について同様にして行った。結果を図16及び図17に検量線として示した。また、非特異抗体の吸着量についても図13のNo. 1、5、6チップを比較することで検討した。結果を図18に示した。

## 【0091】実施例7

実施例1のPEIの時と同様に、金薄膜を70℃ほどに温めた1M、KOH水溶液に数回つけることで洗浄した後、5mM L-システインメチルエステルのDMF溶液に24時間浸した後、これを5%グルタルアルデヒド水溶液に2時間浸けた。これに1%キトサン水溶液を24時間接触させることでキトサンを固定化した。次に、キトサン中のOH基を2MのBrCH<sub>2</sub>COOH/1M NaOH溶液に12時間浸すことでカルボキシル化し、カルボキシメチル化キトサン(CM-chitosan)センサープローブを作製した(図2参照)。

## 【0092】実施例8

PEI膜プローブによる測定と同様に、作製したプローブをSPR装置にセットし、pH7.4 HBS T/バッファーによるベースラインが安定した後、膜中の-COOH基を、0.4M EDC/0.1M NHS 1:1混合溶液をインジェクトして活性化した後、0.5mg/ml BSAを固定化した時の結果を図20に示す。

## 【0093】実施例9

キトサン1.0g、ラウリルスルホン酸ナトリウム0.1gを45%NaOH水溶液70ml中にゆっくり加え、4℃に保ちながら溶解するまで1時間ほど攪拌した。これを-20℃で、12時間ほど放冷した後、i-PrOH125ml、ClCH<sub>2</sub>COOH28.4gを加えて72時間反応させた。続いて、2MHC1を加えていき、白色の結晶を9.8727g得た。次に、この結晶0.5gを10%NaOH水溶液20mlに溶解させた後、4MHC1をpH1になるまで加えた。これに、大量のアセトンを加えることで結晶を析出させ、吸引ろ過により0.7gのCM-chitosanを得た。

## 【0094】実施例10

金薄膜を洗浄した後、10<sup>-3</sup>MのHS-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>COOH/EtOH溶液に2時間、0.4M EDC/0.1M NHSの1:1混合溶液に40分浸した後、実施例9で製造した2%CM-chitosan水溶液に2時間つけることで、キトサン膜センサープローブIを製造した。このプローブを用いて、膜中の-COOH基を、0.4M EDC/0.1M NHS 1:1

混合溶液で活性化し、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$  hIgGを固定化した後、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ のBSAの膜への吸着を測定した結果を図21に示す。

#### 【0095】実施例11

実施例2と同様にして、AFI法によりキトサン膜センサープロブの調製を行った。PEI膜センサープロブの時と同様に金薄膜をSPR装置にセットし、そこからすべての試薬をフロー系に導入して固定化するオールフロー系で固定化法を行った。結果を図24に示す。図24中の、(1)はpH7.4 HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はモノレイヤーのエタノール溶液を添加した時点を、(3)はEDC/NHSの0.2M/0.05Mを添加した時点を、(4)は1%CM-キトサンを添加した時点を、(5)は $0.5\text{mg}/\text{ml}$ のBSAを添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点のレスポンス $\Delta\theta$ が観測された。

#### 【0096】実施例12

PEI膜を0.4MEDC/0.1MNHSの1:1混合液で活性化して、これにプロテインAを固定した。これに、濃度0.1、1、0.10、45、90、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のhIgGをそれぞれのセンサーに流した。AFI法によるPEI膜の経時変化の結果を図27に示す。図27中の1,000R.U.は $1\text{ng}/\text{mm}^2$ である。また、この実験で得られた検量線を図28の左側に示す。

#### 【0097】比較例1

デキストラン膜を用いて実施例12と同様に行った。その結果得られた検量線を、図28の右側に示す。

#### 【0098】

【発明の効果】本発明は、簡便、迅速かつ再現性のよいSPR測定用のセンサープロブとして有用な金属薄膜を提供するものであり、本発明のセンサープロブは高感度で、高精度のものであり、かつ、簡便で安価に製造することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、原料物質として、システインメチルエステル、グルタルアルデヒド及びポリエチレンイミンを用いた場合の本発明の金属薄膜の処理法を示す。

【図2】図2は、原料として、システインメチルエステル、グルタルアルデヒド及びキトサンを用いた場合の本発明の金属薄膜の処理法を示す。

【図3】図3は、本発明のポリエチレンイミン膜を有する金属薄膜にスパーサーとしてスベリン酸を用い、活性エステル化法により検出用試薬（図3中ではリガンドとして示されている。）を固定する方法を示す。

【図4】図4は、図2に示したCM-キトサンセンサープロブに検出用試薬（図4中ではリガンドとして示されている。）を固定する方法を示す。

【図5】図5は、本発明の金属薄膜の調製法と、表面プラズモン共鳴装置の概要と、本発明の金属薄膜のバッ

法とオールフローインジェクト法（AFI法）の概要を示す。

【図6】図6は、本発明のPEI膜を用いたSPRの測定結果であり、横軸に時間（分）、縦軸にレスポンス（アーク秒（1度は3600アーク秒））を示す。図6中の、(1)はpH7.4 HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はBS3を添加した時点を、(3)は $0.5\text{mg}/\text{ml}$ のBSAを添加した時点を、(4)はグリシンpH3を添加した時点をそれぞれ示している。BSAを添加した時点でのレスポンス $\Delta\theta$ は604アーク秒であった。

【図7】図7は、本発明のPEI膜を用いたSPRの測定結果であり、横軸に時間（分）、縦軸にレスポンス（アーク秒（1度は3600アーク秒））を示す。図7中の、(1)はpH7.4 HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はBS3を添加した時点を、(3)は $0.1\text{mg}/\text{ml}$ のhIgGを添加した時点を、(4)はグリシンpH3を添加した時点をそれぞれ示している。hIgGを添加した時点でのレスポンス $\Delta\theta$ は150アーク秒であった。

【図8】図8は、本発明のPEI膜を用いたAFI法によるSPRの測定結果である。図8中の、(1)はpH7.4 HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)は10mM L-システインを添加した時点を、(3)は10%グルタルアルデヒドを添加した時点を、(4)は1%PEIを添加した時点をそれぞれ示している。

【図9】図9は、本発明のPEI膜を用いたAFI法によるSPRの測定結果である。図9中の、(a)はpH7.4 HBS/Tバッファーを添加した時点を、(b)は1mMのBS3を添加した時点を、(c)は $500\mu\text{g}/\text{ml}$ のBSAを添加した時点を、(d)はグリシンpH3を添加した時点を、(e)はpH8.5で0.1Mのエタノールアミンを添加した時点をそれぞれ示している。

【図10】図10は、本発明のPEI膜を用い、緩衝液としてpH5.3酢酸バッファーを用いたときのSPRの測定結果である。図10中の、(1)はpH5.3酢酸バッファーを添加した時点を、(2)はスパーサーのBS3を1mM添加した時点を、(3)は $0.5\text{mg}/\text{ml}$ のBSA溶液を添加した時点を、(4)は0.1Mのグリシン（pH3.0）を添加した時点をそれぞれ示している。

【図11】図11は、本発明のPEI膜を用い、膜中のアミノ基を100mMグリオキシル酸と反応させカルボキシル化したときのSPRの測定結果である。図11中の、(1)はpH7.4 HBSバッファーを添加した時点を、(2)は0.4MEDC/0.1MNHSを添加した時点を、(3)は $0.5\text{mg}/\text{ml}$ のBSA溶液を添加した時点を、(4)は0.1Mのグリシン（pH

3. 0)を添加した時点をそれぞれ示している。

【図12】図12は、本発明のPEI膜の未反応のアミノ基どうしを、グルタルアルデヒドで架橋することによって活性化するように模式的に示したものである。

【図13】図13は、本発明の測定に用いた8種類のプローブをまとめて示したものである。

【図14】図14は、本発明の図13に記載のNo. 8のプローブを用いて測定を行った時のhIgG検出のリアルタイムプロットを示したものである。図14中の、(1)はHBS/NHSバッファーを添加した時点を、(2)はEDC/NHSを添加した時点を、(3)は200 $\mu$ g/mlの抗hIgGを添加した時点を、(4)はエタノールアミンを添加した時点を、(5)はグリシンを添加した時点を、(6)は0.1 $\mu$ g/mlのhIgGを添加した時点を、(7)は1.0 $\mu$ g/mlのhIgGを添加した時点をそれぞれ示している。

【図15】図15は、hIgGを濃度を60、160、再び60 $\mu$ g/ml hIgGに変化させて膜に接触させ、得られるレスポンスを示したものである。

【図16】図16は、本発明のセンサープローブを用いた検量線を示す。図16中の左側はBS3で活性化したバッチ法によるものであり、右側はEDC/NHSで活性化したバッチ法によるものであり、黒三角印及び白四角印はプロテインA-hIgG系を示し、黒丸印及び白バツ印は抗hIgG-hIgG系を示す。

【図17】図17は、本発明のセンサープローブを用いた検量線を示す。図17中の左側はEDC/NHSで活性化したバッチ法によるものであり、右側はEDC/NHSで活性化したAFI法によるものであり、白四角印及び白丸印はプロテインA-hIgG系を示し、バツ印及び白菱形印は抗hIgG-hIgG系を示す。

【図18】図18は、本発明のセンサープローブを用いたときの非特異抗体の吸着量を示す。図18中のグレーの棒はhIgGを示し、斜線の棒はマウスIgGを示し、横線の棒はチキンIgGを示す。いずれの濃度も90 $\mu$ g/mlである。

【図19】図19は、センサープローブの表面の膜構造をもし九滴に示したものである。

【図20】図20は、本発明のCM-キトサン膜を用いたSPR測定の結果を示す。図20中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)は0.4MEDC/0.1MNHSを添加した時点を、(3)は0.5mg/mlのBSA溶液を添加した時点を、(4)はエタノールアミンを添加した時点をそれぞれ

れ示している。

【図21】図21は、本発明のCM-キトサン膜を用いたSPR測定の結果を示す。図21中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はEDC/NHSを添加した時点を、(3)は0.2mg/mlのIgG溶液を添加した時点を、(4)はエタノールアミンを添加した時点を、(5)は500 $\mu$ g/mlのBSAを添加した時点をそれぞれ示している。

【図22】図22は、活性化をせずに本発明のCM-キトサン膜を用いたSPR測定の結果を示す。図22中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はグリシン/HCl(pH3)を添加した時点を、(3)は500 $\mu$ g/mlのBSAを添加した時点をそれぞれ示している。

【図23】図23は、活性化をせずに本発明のCM-キトサン膜を用いたSPR測定の結果を示す。図23中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)は500 $\mu$ g/mlのBSAを添加した時点をそれぞれ示している。

【図24】図24は、本発明のCM-キトサン膜を用いたAFI法によるSPR測定の結果を示す。図24中の、(1)はpH7.4HBS/Tバッファーを添加した時点を、(2)はモノレイヤーのエタノール溶液を添加した時点を、(3)はEDC/NHSの0.2M/0.05Mを添加した時点を、(4)は1%CM-キトサンを添加した時点を、(5)は0.5mg/mlのBSAを添加した時点をそれぞれ示している。

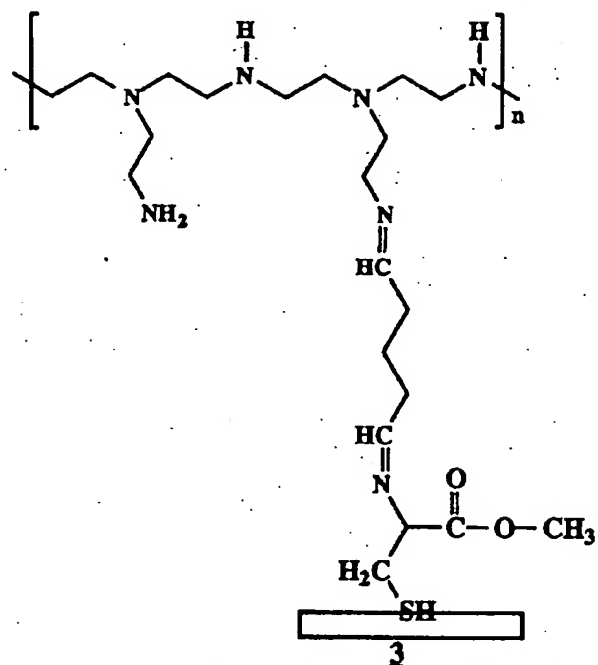
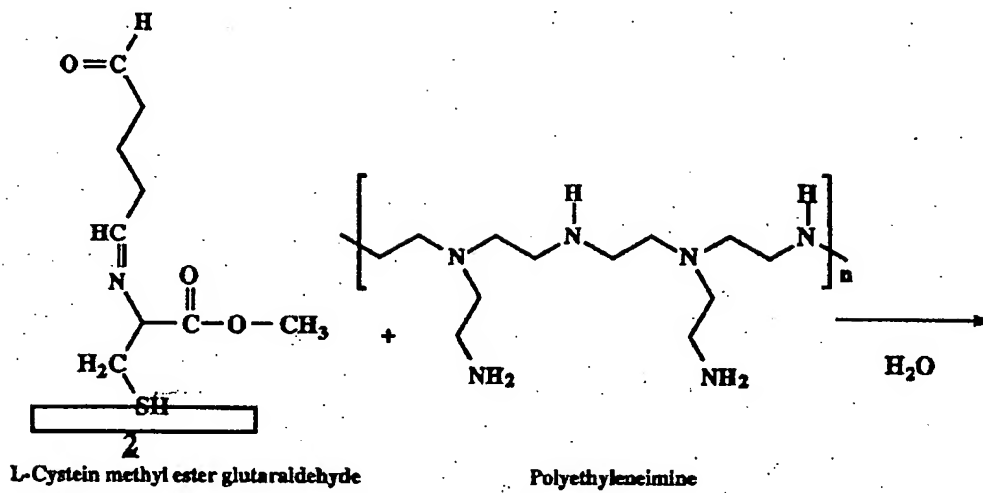
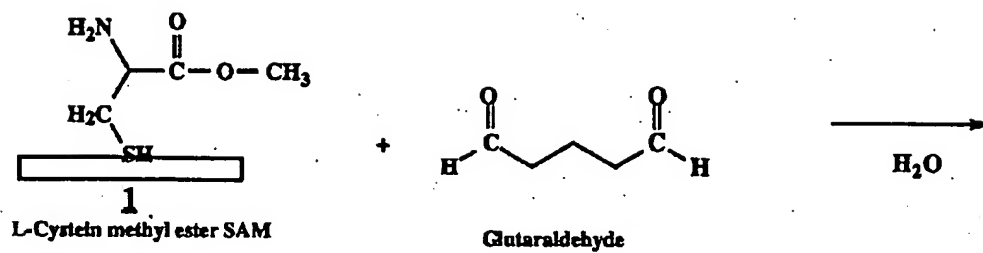
【図25】図25は、本発明のプローブを用いたときの検量線を示す。図25中の丸印はPEI膜プローブを用いたAFI法によるものであり、四角印はPEI膜プローブを用いたバッチ法によるものであり、三角印はCM-キトサン膜プローブを用いたバッチ法によるものである。

【図26】図26は、本発明のセンサープローブを用いたときの非特異抗体の吸着量を示す。図26中のグレーの棒はhIgGを示し、斜線の棒はマウスIgGを示し、横線の棒はチキンIgGを示す。いずれの濃度も90 $\mu$ g/mlである。

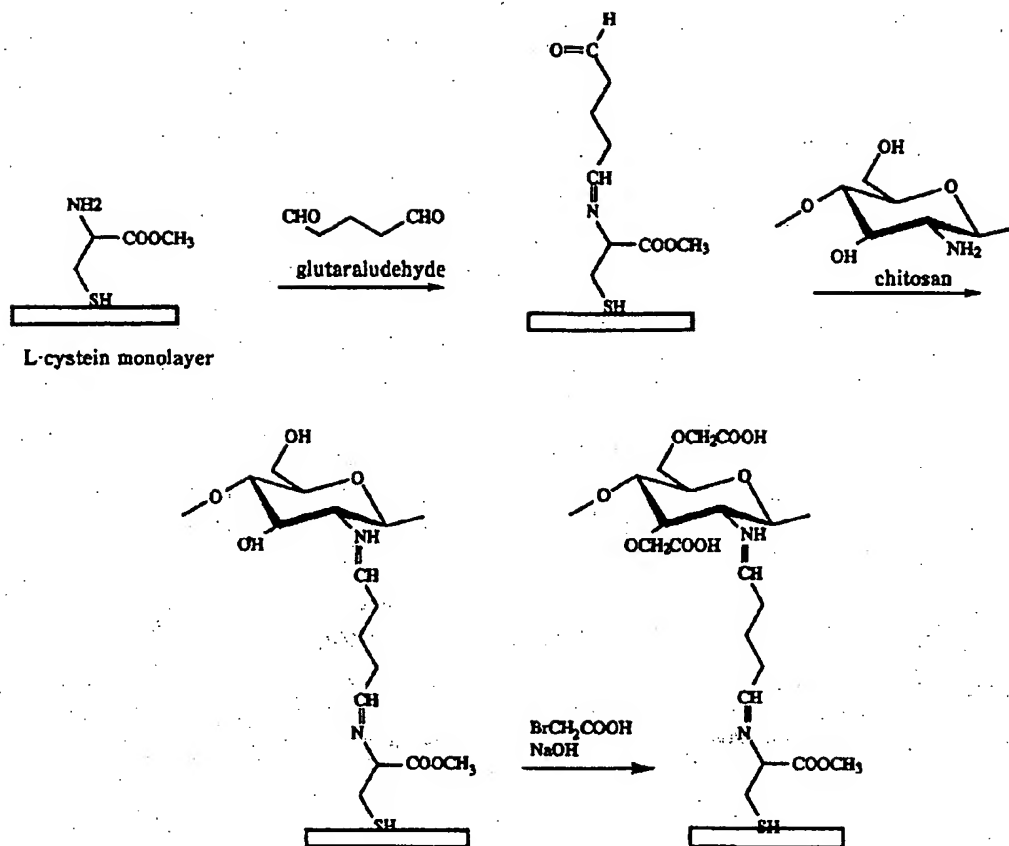
【図27】図27は、本発明のPEI膜にプロテインAを固定したセンサーを用いた、各種濃度のhIgGにおける経時変化を示したものである。図27中の1.00OR.Uは1ng/mm<sup>2</sup>である。

【図28】図28は、実施例12及び比較例1で得られた検量線を示したものである。

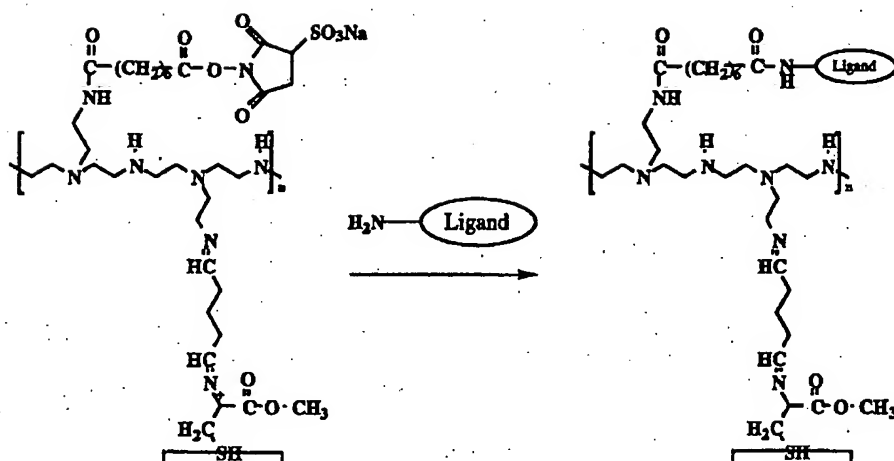
【図1】



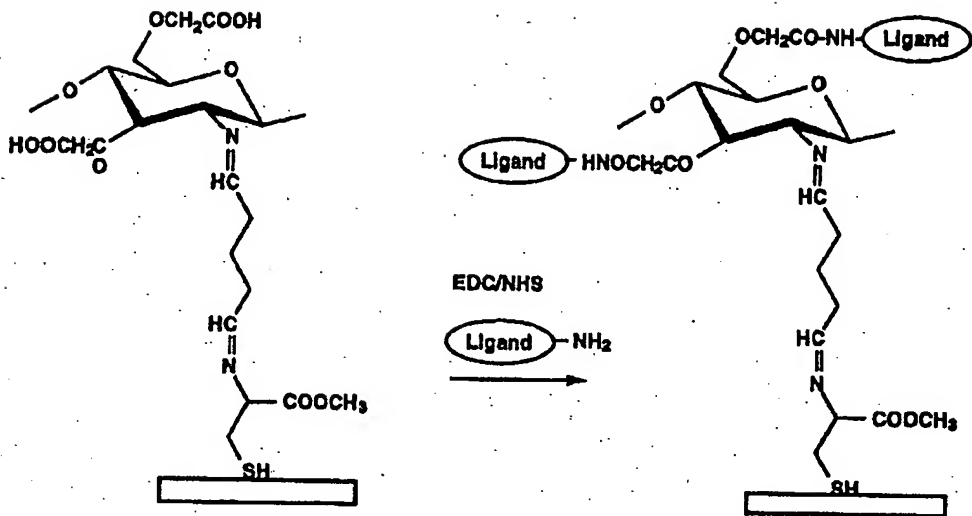
【図2】



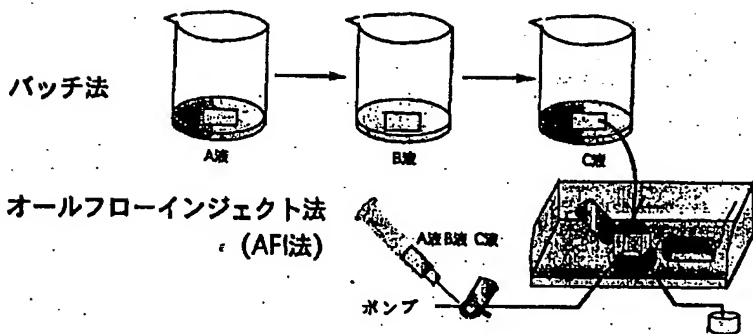
【図3】



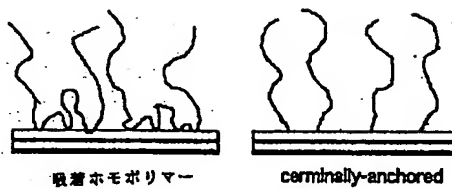
【図4】



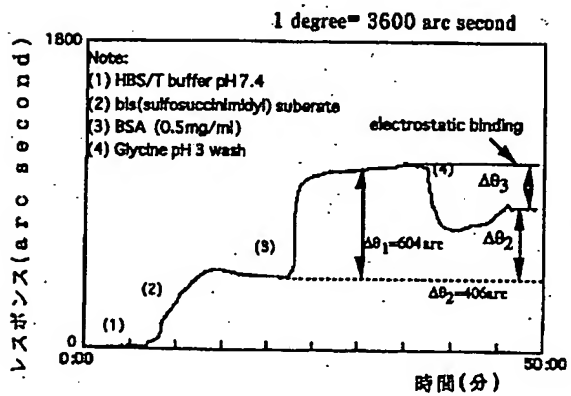
【図5】



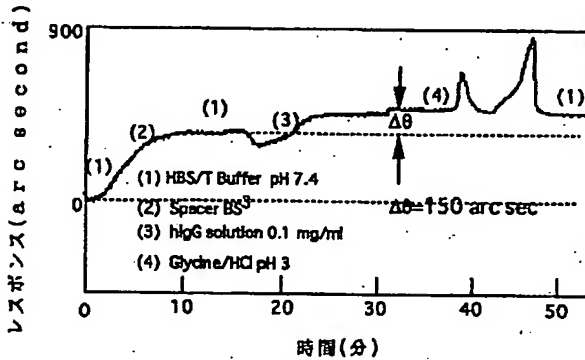
【図19】



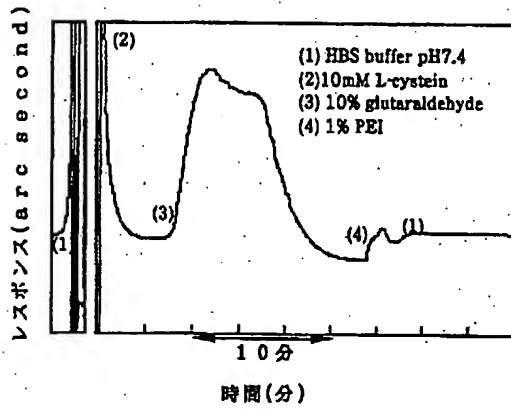
【図6】



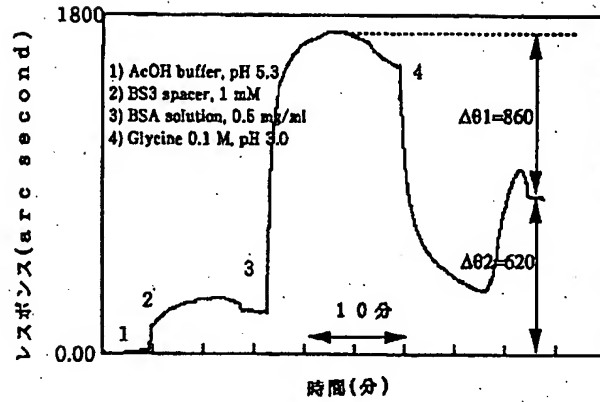
【図7】



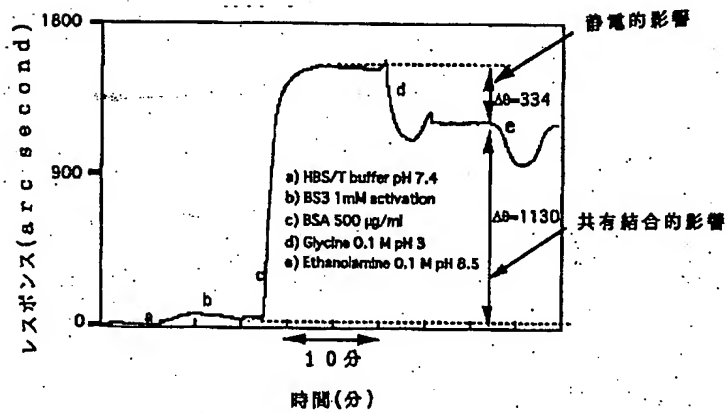
【図8】



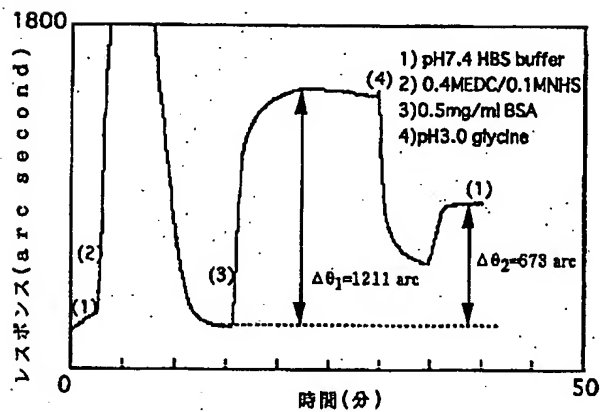
【図10】



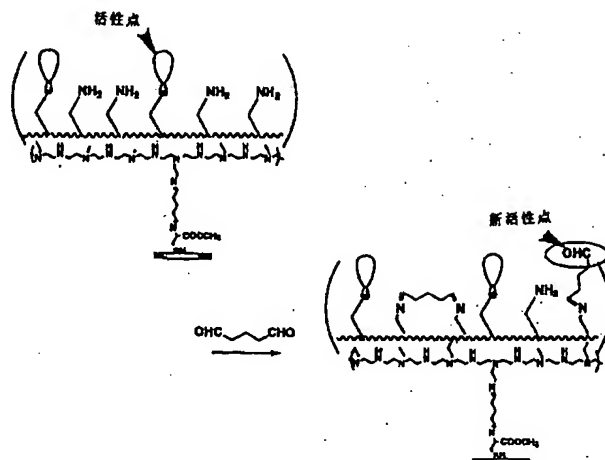
【図9】



【図11】

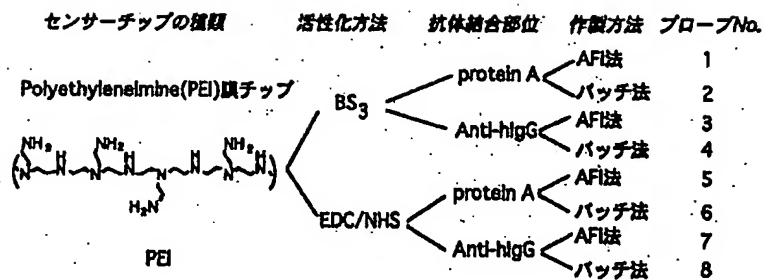


【図12】

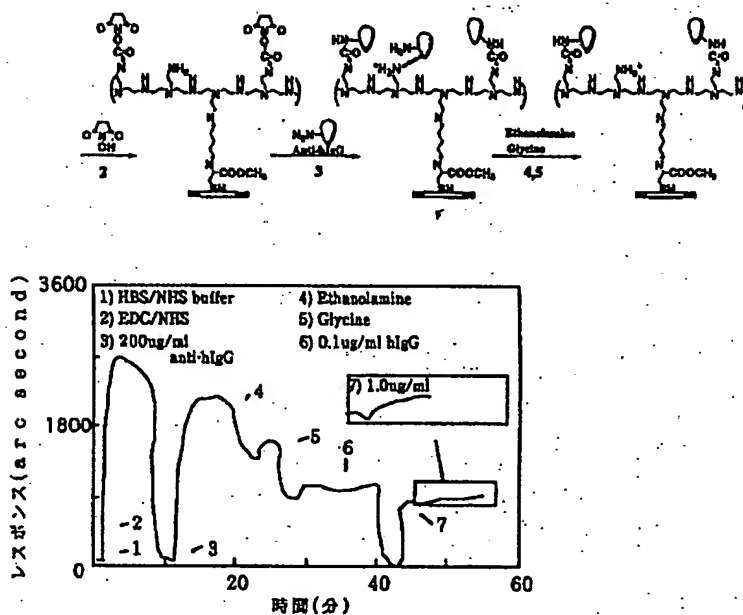




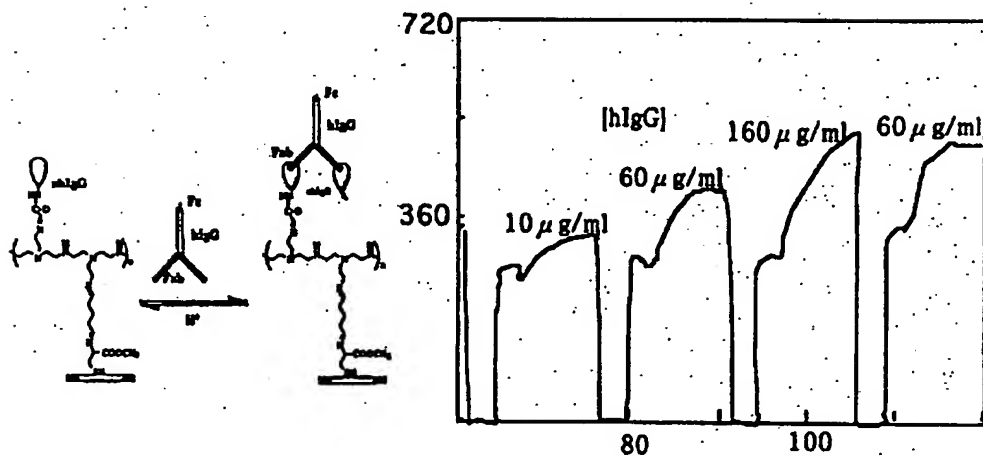
【図13】



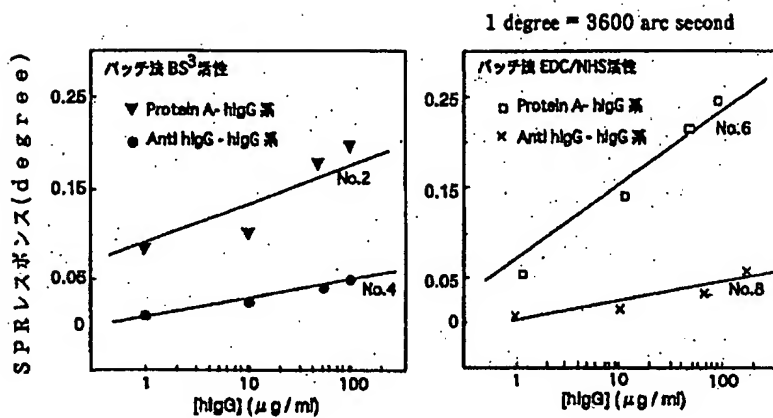
【図14】



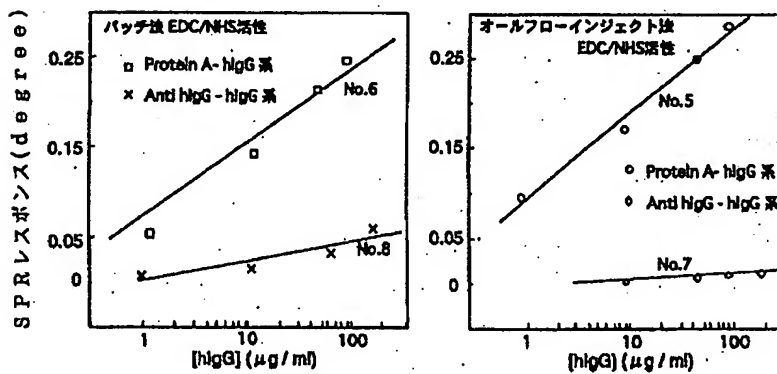
【図15】



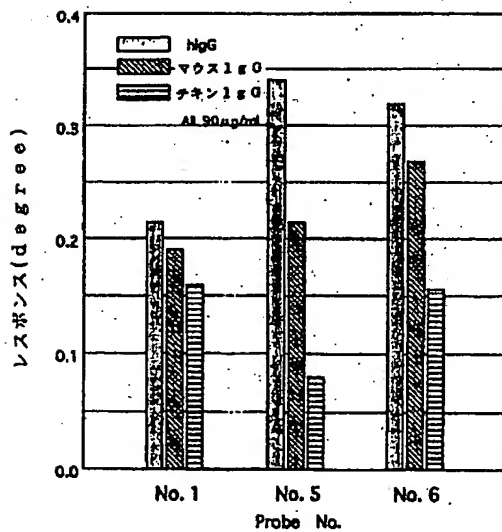
【図16】



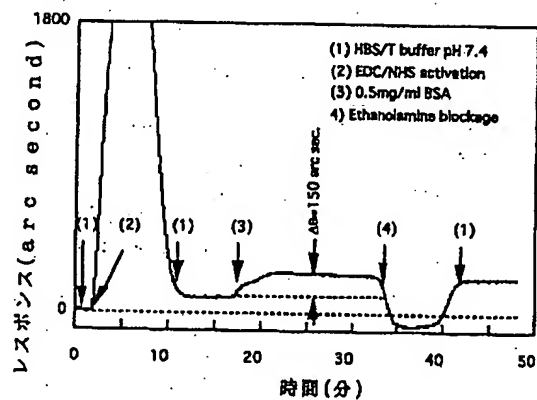
【図17】



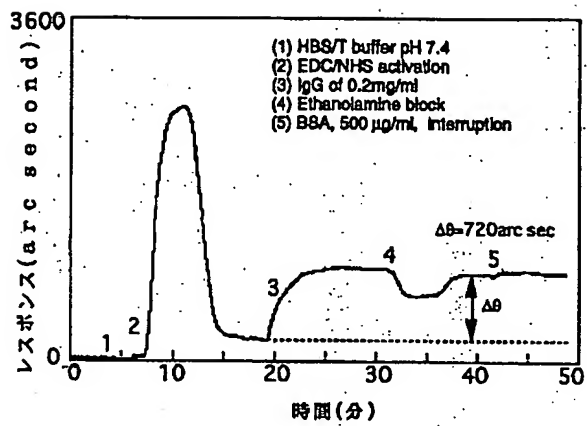
【図18】



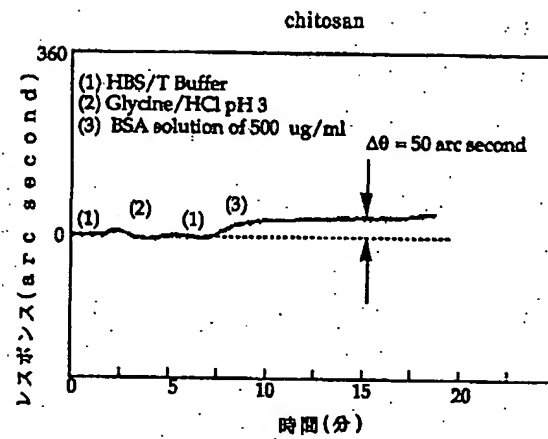
【図20】



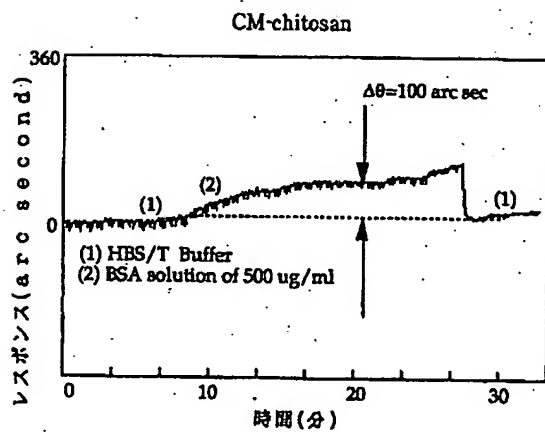
【図21】



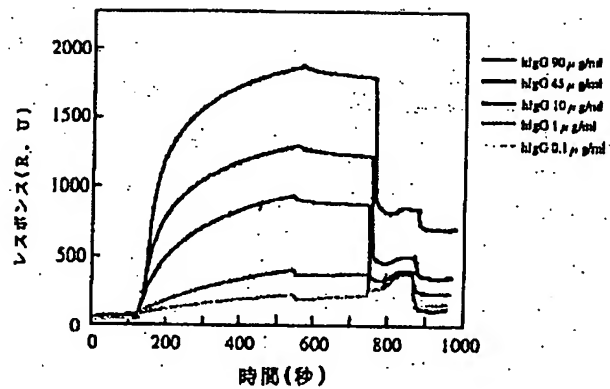
【図22】



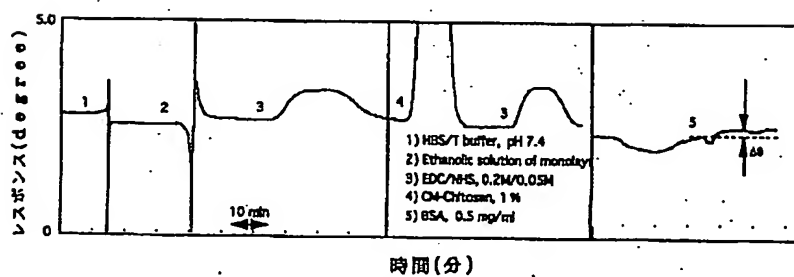
【図23】



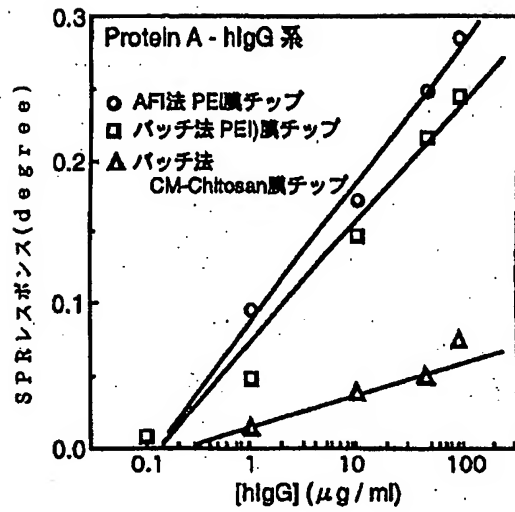
【図27】



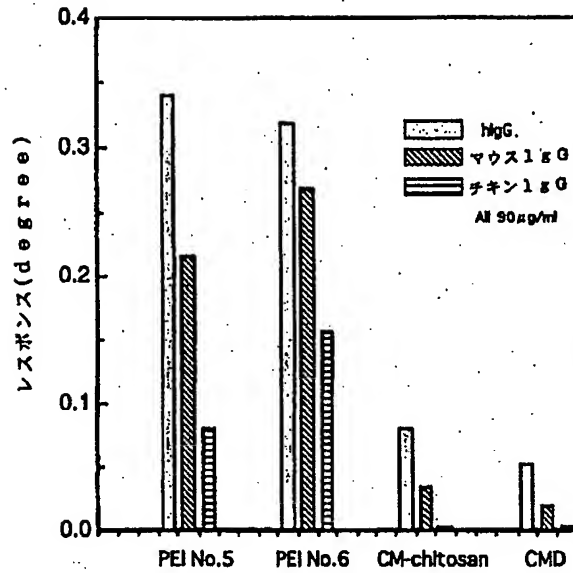
【図24】



【図25】



【図26】



【図28】

